

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene, Fleischhygiene und -technologie
– Fachrichtung Fleischhygiene –
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Auflichtfluoreszenzmikroskopie als Schnellmethode
zur Keimzahlbestimmung der Oberflächenmikroflora von Fleisch
bei gleichzeitiger Abgrenzung vermehrungsfähiger
von abgestorbenen Zellen**

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helmut Loos
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1983
Journal-Nr. 1127



Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene, Fleischhygiene und -technologie
– Fachrichtung Fleischhygiene –
des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Auflichtfluoreszenzmikroskopie als Schnellmethode
zur Keimzahlbestimmung der Oberflächenmikroflora von Fleisch
bei gleichzeitiger Abgrenzung vermehrungsfähiger
von abgestorbenen Zellen**

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Helmut Loos
Tierarzt aus Berlin

Berlin 1983
Journal-Nr. 1127



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner

Referent : Prof. Dr. G. Reuter

Korreferent : Prof. Dr. H. Weiß

Tag der Promotion : 20. Mai 1983

Für Robert

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen
eines vom Bundesministerium für Familie,
Jugend und Gesundheit geförderten
Forschungsvorhabens angefertigt.

Erläuterungen im Text verwendeter Abkürzungen

ETS(+)	: <u>E</u> lektronen <u>t</u> ransport <u>s</u> ystem-positiv
ETS(-)	: <u>E</u> lektronen <u>t</u> ransport <u>s</u> ystem-negativ
Cfu	: <u>C</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nits
GKZ	: mikroskopische <u>G</u> esamt <u>k</u> eim <u>z</u> ahl
RKI	: <u>R</u> obert <u>K</u> och <u>I</u> nstitut, Berlin
BGA	: <u>B</u> undes <u>g</u> esundheits <u>s</u> amt, Berlin
DNA	: <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
RNA	: <u>R</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
AO	: <u>A</u> cridin <u>o</u> range
INT	: <u>I</u> odo(<u>J</u> od-)phenyl- <u>N</u> itrophenyl- <u>T</u> etrazoliumchlorid
PPL	: <u>P</u> hosphat- <u>P</u> uffer- <u>L</u> ösung
h	: Stunden
nm	: Nanometer (10^{-9} Meter)
μ m	: Mikrometer (10^{-6} Meter)
Upm	: <u>U</u> mdrehungen <u>p</u> ro <u>M</u> inute
r	: Korrelationskoeffizient
rs	: Residualstreuung

I.	Einleitung	1
II.	Literatur	2
1.	Mikroskopische Nachweisverfahren in der quantitativen Mikrobiologie	2
1.1.	Mikroskopische Keimzählung im Lichtmikroskop	2
2.	Untersuchungsmethoden in Verbindung mit der Fluoreszenzmikroskopie	3
2.1.	Zum Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie	3
2.2.	Immunfluoreszenzmikroskopie	5
2.3.	Mikrokolonief luoreszenz-Mikroskopie auf Membranfiltern	7
2.4.	Direkte Fluorochromierung von Mikroorganismen	7
2.4.1	Untersuchungssubstrate und verwendete Fluorochrome	8
2.4.2	Aufbereitungsverfahren für die Untersuchung von Lebensmitteln mit dem Epifluoreszenzmikroskop	10
2.5.	Fluorochromierung und Nachweis von Mikroorganismen auf Polycarbonat-Filtermembranen	11
3.	Zur Differenzierbarkeit lebender von abgestorbenen Mikroorganismen mit herkömmlichen Färbemethoden der Fluoreszenzmikroskopie	13
4.	Abgrenzung ETS (Elektronentransportsystem)-positiver von ETS-negativen Mikroorganismen als Parameter der Vermehrungsfähigkeit der Zellen durch die Epifluoreszenzmikroskopie	15
III.	Eigene Untersuchungen	17
1.	Material und Methodik	17
1.1.	Versuche mit Reinkulturen	17
1.1.1.	Herkunft und Ansatz der Reinkulturen	17
1.1.2.	Untersuchungsgang für die Epifluoreszenzmikroskopie	19
2.	Versuche mit nativen Proben (Abtrage- und Spülprouen von Fleischoberflächen)	22
2.1.	Probenmaterial und Probenentnahmetechnik	22

III.	2.2.	Verarbeitung der Proben zur kulturellen Keimzahlbestimmung	23
	2.3.	Keimzahlbestimmung mit der Epifluoreszenzmikroskopie	23
IV.		E r g e b n i s s e	27
	1.	Versuche mit Reinkulturen	27
	1.1.	Vergleich der Drop plating-Werte zur Zahl ETS-positiver Mikroorganismen	27
	1.2.	Vergleich der im Spatel-Verfahren erzielten Werte zur Zahl ETS-positiver Mikroorganismen	33
	1.3.	Vergleich Drop plating/ETS-positive Mikroorganismen zu Spatel-Verfahren/ETS-positive Mikroorganismen	34
	1.4.	Zusammenhang zwischen der mikroskopisch ermittelten Anzahl atmender Mikroorganismen und der mikroskopischen Gesamtkeimzahl	35
	1.5.	Prozentualer Anteil ETS-positiver Mikroorganismen an der mikroskopisch ermittelten Gesamtkeimzahl	35
	2.	Keimzahlbestimmung in Abtrageproben	40
	2.1.	Einfluß des Vorfiltrierens auf die Keimzahlausbeute beim Epifluoreszenzverfahren	40
	2.2.	Vergleich der Drop plating-Werte zur Zahl ETS-positiver Mikroorganismen	42
	2.2.1.	Zusammenhang zwischen mikroskopisch ermittelter Gesamtkeimzahl und ETS-positiven Mikroorganismen	42
	2.2.2.	Vergleich der Drop plating-Werte zu mikroskopischer Gesamtkeimzahl	46
	3.	Keimzahlbestimmung in Abspülproben	46
	3.1.	Einfluß des Vorfiltrierens auf die Keimzahlausbeute beim Epifluoreszenzverfahren	46
	3.2.	Vergleich der Drop plating-Werte zur Anzahl ETS-positiver Mikroorganismen	49
	3.2.1.	Zusammenhang zwischen mikroskopisch ermittelter Gesamtkeimzahl und ETS-positiven Mikroorganismen	49

IV.	3.2.2.	Vergleich der Drop plating-Werte zur mikroskopischen Gesamtkeimzahl	53
	4.	Zur Dauer der möglichen Aufbewahrungszeit der Filterpräparate	53
	5.	Versuche zur Anwendung der Epifluoreszenzmethode bei anderen Fleischproben (Hackfleisch, Rohwurst, Fleischkonserven) und Überprüfung der Auswertetechnik sowie der personenabhängigen Reproduzierbarkeit	55
	5.1.	Statistische Absicherung der Auswertetechnik	55
	5.2.	Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei verschiedenen Fleischproben (Hackfleisch, Rohwurst, Fleischkonserven)	56
V.		D i s k u s s i o n d e r E r g e b n i s s e	63
	1.	Grundsätzlich zu beachtende methodische Voraussetzungen beim quantitativen Nachweis von lebenden und toten Zellen mit der Epifluoreszenztechnik	63
	2.	Aussagekraft des Epifluoreszenzverfahrens im Vergleich zu kulturellen Verfahren bei Reinkulturen	67
	3.	Anwendbarkeit des Epifluoreszenzverfahrens bei nativen Proben (Abspül- und Abtrageproben von Fleischoberflächen)	69
	4.	Aussagekraft der Zahl atmungsaktiver Zellen	71
	5.	Aussagekraft der mikroskopischen Gesamtkeimzahl im Vergleich zur Zahl der atmungsaktiven Zellen	72
	6.	Nachteile der manuellen Auswertung und Möglichkeit des Einsatzes automatischer Bildauswertersysteme	73
	7.	Wertbestimmende Merkmale des Epifluoreszenzverfahrens	75
VI.		S c h l u ß f o l g e r u n g e n	78
VII.		Z u s a m m e n f a s s u n g	81

VIII. Summary	85
IX. Anhang	88
X. Literaturverzeichnis	118

I. Einleitung

Um eine routinemäßige Überwachung der hygienischen Qualität von Fleisch und Fleischerzeugnissen zu ermöglichen, bedarf es Untersuchungsmethoden, die den aktuellen Anforderungen des internationalen Warenaustausches entsprechen. Dabei ist den Kriterien der Kosten des Verfahrens, seiner Dauer, seiner Reproduzierbarkeit und seiner Aussagekraft Rechnung zu tragen.

Die kontinuierliche Zunahme des Handels sowie der Vertrieb von Fleisch über Ladenketten stellen die zuständigen Behörden bei der praktischen Überwachungstätigkeit vor allem vor zeitliche Probleme, da die Verweildauer der Schlacht tierkörper und somit die Möglichkeit, schon hier regulierend einzugreifen, in den einzelnen Betrieben immer kürzer wird.

Die noch heute zur Qualitätskontrolle verwendete "klassische" Methode des kulturellen Keimnachweises hält diesen Anforderungen allein nicht mehr stand, da ein aussagekräftiges Ergebnis nicht unter 18 bis 24 Stunden, in speziellen Fällen 36 bis 48 Stunden, zu erzielen ist. Dem Nachteil der Zeiterfordernis steht hierbei jedoch der Vorteil der relativen Genauigkeit gegenüber, ein Kriterium, das bei den sogenannten Schnellmethoden nicht in jedem Fall oder nur unter bestimmten Bedingungen gegeben ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte als "Schnellmethode" die direkte Keimzahlbestimmung im Auflichtfluoreszenzmikroskop aus Abtrage- und Abspülproben von Rinderschlachthälften mit dem "klassischen" Drop plating-Verfahren (REUTER, 1970) verglichen und auf seine Aussagekraft geprüft werden. Der kulturell erzielten Anzahl an Colony forming units (Cfu) wurde dabei der Begriff der Elektronentransportsystem-positiven =ETS(+) Mikroorganismen als Parameter für die Anzahl atmungsaktiver, d.h. lebensfähiger Keime gegenübergestellt. Gleichzeitig wurde die mikroskopisch erfaßbare Gesamtkeimzahl bestimmt. Als besonderes Problem stellte sich die Ausschaltung einer Fremdfloreszenz durch organisches Begleitmaterial dar.



II. L i t e r a t u r

II.1. Mikroskopische Nachweisverfahren in der quantitativen Mikrobiologie

II.1.1. Mikroskopische Keimzählung im Lichtmikroskop

Nach übereinstimmenden Untersuchungsergebnissen mehrerer Autoren (WOHLFEIL, 1933; BEM et al., 1976; STRASSER, 1979) ist eine gute quantitative Aussage über die Gesamtkeimzahl an Mikroorganismen in flüssigen Probesubstraten durch die mikroskopische Keimzählung möglich.

BEM et al. (1976) führten Untersuchungen von Fleischabschwemmungen und Fleischhomogenisaten durch, die, nach vorheriger Filtration durch einen Faltenfilter zur Abtrennung gröberer Partikel, in eine Zählkammer nach Thoma eingebracht und ausgezählt wurden. Dem Vorteil der schnellen Auswertung stand hierbei der Nachteil gegenüber, daß zwischen lebenden und toten Zellen nicht unterschieden werden kann und daß geschultes Personal zur Auswertung erforderlich ist. Ein weiterer Nachteil ist die schnelle Ermüdbarkeit der Betrachter sowie die Verwechslungsmöglichkeit von Mikroorganismen, insbesondere von kokkoiden Keimen oder Kokken, mit im Substrat vorhandenen Verunreinigungen (WOHLFEIL, 1933; STRASSER, 1979).

WINTER et al. (1971) konzentrierten aus Gemüseaufschwemmungen gewonnene Keime auf Membranfiltern, die auf nährstoffgetränkte Scheiben gelegt wurden und so Gelegenheit hatten, zu Kolonien auszuwachsen. Nach mindestens 4 Stunden wurden die Kolonien mit "Janus B-Grün" angefärbt und im Lichtmikroskop ausgezählt. Die Autoren erzielten gute Korrelationen im Vergleich zu kulturellen Verfahren.

II.2. Untersuchungsmethoden in Verbindung mit der Fluoreszenz- mikroskopie

II.2.1. Zum Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Unter Fluoreszenz versteht man die Fähigkeit eines Stoffes, eine ihm zugeführte Energie in Form von Strahlung wieder abzugeben und dadurch ein fluoreszierendes Licht zu emittieren. Diese Fähigkeit kommt bei einer Vielzahl von Stoffen und Verbindungen vor. Man nennt diese Fluorochrome.

In der Fluoreszenzmikroskopie werden diese Stoffe benutzt, um Objekte oder Strukturen darzustellen, nachdem man diese mit einem entsprechenden Fluorochrom markierte. Hierbei unterscheidet man verschiedene Möglichkeiten der Verbindung von Objekt und Fluorochrom, und zwar die direkte Anfärbung und die indirekte Anfärbung von Objekten. Bei der letzteren bedient man sich entweder einer immunologischen Reaktion (Antigen-Antikörper), um den mit einem Fluorochrom gekoppelten Reaktionspartner an das Objekt zu binden oder der Zugabe eines Fluorochroms zu einem Nährsubstrat, welches von den Mikroorganismen verstoffwechselt wird und damit den Fluoreszenzfarbstoff an die darzustellenden Objekte koppelt.

Allen Methoden gemeinsam ist die im Verhältnis zur Lichtmikroskopie bessere Abgrenzungsmöglichkeit der gesuchten Objekte gegenüber im Untersuchungsmaterial vorhandenen Begleitpartikeln, wie sie z.B. in eiweißreichen Probesubstraten häufig sind.

Da jedes Fluorochrom ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum aufweist (WALTER, 1964), kann man sich durch eine geeignete Wahl von Filtern oder Filterkombinationen, die in den Strahlengang des Erregerlichtes und des erzeugten Fluoreszenzlichtes eingebracht werden, der gewünschten, für den jeweiligen Zweck optimalen Fluoreszenzstrahlung bedienen. Aus dieser Tatsache ist ersichtlich, daß durch die Kopplung bestimmter Fluorochrome an bestimmte Objekte diese selektiv untersucht werden können. Sie

lassen sich im mikroskopischen Bild deutlich von dem sie umgebenden Medium abgrenzen, wenn man mit der für das Fluorochrom spezifischen Anregungsstrahlung arbeitet.

Eine besondere Form der Fluoreszenzmikroskopie stellt die Auflichtfluoreszenzanregung dar, bei der die anregende Strahlung durch das Objektiv geführt wird, von oben auf das Präparat fällt und somit die Anregungsstrahlung im Objektfeld konzentriert. Das von den im Präparat vorhandenen fluoreszierenden Objekten emittierte Licht wird wiederum vom Objektiv gebündelt und gelangt durch einen Teilerspiegel und einen Sperrfilter zu den Okularen. Bei dieser Art der Anregung wird, je nach Qualität des Objekthintergrundes, nur die von den fluoreszierenden Objekten ausgehende Strahlung im Gesichtsfeld wahrgenommen, da die nicht reflektierte Anregungsstrahlung durch das Präparat hindurchfällt. Ein weiterer Vorteil ist die gleichzeitige Benutzbarkeit des Durchlichtstrahlenganges für normales Licht, was zu einem erleichterten Auffinden der Objektebene führt, ohne das Präparat schon der anregenden Fluoreszenzstrahlung aussetzen zu müssen. Um sich der Methodik der Auflichtfluoreszenz bedienen zu können, bedarf es jedoch einer zusätzlichen apparativen Ergänzung des Lichtmikroskopes, die eine spezielle Lichtquelle (Hg-Höchstdruckdampfampe oder Halogenlampe), eine Umlenkeinrichtung für den Strahlengang des erzeugten und des reflektierten Fluoreszenzlichtes mit speziellen Erregerfiltern und Sperrfiltern sowie Ölimmersions-Objektive mit großer Apertur erforderlich macht.

II.2.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Das Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie beruht auf der Verbindung fluorochromierter Antikörper mit spezifischen Antigenen oder umgekehrt. Durch das stabile "Beladen" von Antikörpern oder Antigenen mit einem Fluorochrom wird die hohe Nachweisempfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden noch durch die Spezifität serologischer Verfahren verbessert.

a) Direkte Methode

Man markiert entweder das Antigen oder den Antikörper mit dem auserwählten Fluorochrom und läßt sie mit dem Probesubstrat reagieren. Ist in diesem ein Reaktionspartner vorhanden (entweder das passende Antigen oder der entsprechende Antikörper), so entsteht ein Konjugat, d.h., durch die Antigen-Antikörper-Reaktion wird das Fluorochrom im Idealfall selektiv an die gesuchte Substanz gekoppelt und ermöglicht somit deren Nachweis im Fluoreszenzmikroskop.

b) Indirekte Methode

Diese Reaktion findet in zwei Stufen statt. Nach einer "normalen" Antigen-Antikörper-Reaktion wird ein zweiter, mit einem Fluorochrom gekoppelter Antikörper hinzugegeben, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Es entsteht ein Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplex, der mit einem Fluorochrom gekoppelt ist und dadurch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann.

Voraussetzung für die Methodik der Immunfluoreszenz ist das Vorhandensein eines bekannten oder vermuteten Reaktionspartners (Antigen oder Antikörper), da es nur mit diesem zu einer spezifischen Reaktion kommen kann. Das bedeutet gleichzeitig, daß nur gezielt in die Richtung untersucht werden kann, die durch die Spezifität des fluorochromierten Reaktionspartners vorgegeben ist. Der Nachweis bestimmter Mikroorganismen auf dem beschriebenen Weg ist in zahlreichen Substraten durchgeführt worden.

GUTHRIE & REEDER (1969) wiesen bekannte Stämme von E.coli in Wasser nach, die sie zu den natürlicherweise im Substrat vorkommenden Mikroorganismen hinzugesetzt hatten. THOMASON (1971) und THOMASON et al. (1975) wiesen Salmonellen-Stämme in Nahrungs- und Futtermitteln nach, indem sie polyvalente Salmonellen-Antisera mit den Substraten reagieren ließen. Ähnliche Versuche, die auf den Erkenntnissen von THOMASON basierten, führten BARREL & PATON (1978) mit Lebensmitteln durch. Auch bei ihnen stand der Nachweis von Salmonellen durch die Immunfluoreszenz im Vordergrund, wenngleich sich die Autoren zur Auswertung ihrer Proben halbautomatischer Untersuchungsmethoden bedienten. Von der Annahme ausgehend, daß die Fluoreszenzintensität spezifisch markierter Mikroorganismen eine größere sei als die kreuzreagierender Stämme, die ebenfalls mit dem fluorochromierten Antikörper reagieren, zogen sie diesen Helligkeitsunterschied im mikroskopischen Bild zur Auswertung heran. Dabei wurde die erzeugte Fluoreszenzintensität von einem Sensor ausgewertet, der auf das Mikroskop montiert war. Der Sensor war so eingestellt, daß er ab einer bestimmten Helligkeitsschwelle, die variabel ist, ein Signal aussandte, welches wiederum graphisch dargestellt werden konnte. Die Autoren werteten die Proben, bei denen der Sensor ein Signal aufnahm bzw. abgab, zusätzlich visuell aus, um sicherzugehen, daß die erzeugte Fluoreszenz von Mikroorganismen und nicht von Begleitpartikeln (Muskelfasern, Detritus) aus dem Probesubstrat stammte.

DAHLE & LAAKE (1981) benutzten die indirekte Immunfluoreszenz, um fünf aus Meereswasser isolierte Bakterienstämme in ihrer Wachstumsdynamik im Plankton zu charakterisieren. Die durch Immunisierung von Kaninchen mit den ausgewählten Stämmen erzeugten Antikörper reagierten im Probesubstrat mit den entsprechenden Antigenen. Durch Zugabe von Anti-Kaninchen-Immunglobulin G, das vom Schwein stammte und mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt war, wurde der Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplex erzeugt und fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

II.2.3. Mikrokoloniefluoreszenz-Mikroskopie auf Membranfiltern

Diese von BAUMGART et al. (1981) bei Abspülflüssigkeiten von Fleischoberflächen durchgeführte Methode vereint die Vorteile des kulturellen Wachstumsnachweises mit der Präzision des Auflichtfluoreszenzverfahrens. Die zu untersuchenden flüssigen Probesubstrate wurden durch Membranfilter gesaugt und die enthaltenen Mikroorganismen somit auf den Filtern konzentriert. Die Filterscheiben wurden auf sterile Nährkartonscheiben gelegt, die mit Standard-I-Nährbouillon getränkt waren, der das Fluorochrom ANS (8-Anilino-naphthalin-1-Sulfonsäure, Mg-Salz) zugesetzt war. Diese Substanz fluoresziert bei 340 bis 380 nm im UV-Licht. Nach Bebrütung der Filter für mindestens 8 Stunden kann man diese im Auflichtfluoreszenzmikroskop betrachten und die gebildeten Mikrokolonien auszählen. Es wurden gute Korrelationen zum Drop plating-Verfahren ermittelt, allerdings beinhaltet diese Methode eine mindestens achtstündige Bebrütungszeit. Ein Vorteil dieses kombinierten Verfahrens besteht in der Möglichkeit, durch die Anwendung von Selektivmedien gezielt relevante Keimgruppen zu erfassen (BAUMGART et al., 1981).

II.2.4. Direkte Fluorochromierung von Mikroorganismen

Die direkte Bakterienanfärbung mit Fluorochromen ist bereits von vielen Autoren in den unterschiedlichsten Probesubstraten angewandt worden. Neben der Einfachheit dieses Verfahrens stellen seine Schnelligkeit und die gute Abgrenzungsmöglichkeit der Keime gegenüber im Untersuchungsmaterial vorkommenden Begleitpartikeln Gesichtspunkte dar, die es für "Schnellnachweismethoden" besonders geeignet erscheinen läßt.

II.2.4.1. Untersuchungssubstrate und verwendete Fluorochrome

STRUGGER (1942) war der erste, der in der Erde vorkommende Bakterien direkt mit dem Fluorochrom Acridinorange anfärbte. Er propagierte die Unterscheidungsmöglichkeit lebender von toten Mikroorganismen mit Hilfe der erzeugten Fluoreszenz. Seitdem haben sich viele Autoren der Fluorochromierung von Bakterien bedient, teils um qualitative, teils um quantitative Aussagen zu treffen. REPENTIGNY et al. (1965), KORGAONKAR & RANADE (1965) und BUCHERER (1965) führten Untersuchungen an Reinkulturen durch, bei denen sie ebenfalls Acridinorange als Farbstoff benutzten. Ihre Ergebnisse standen in deutlichem Widerspruch zu der von STRUGGER postulierten "Lebend-Tot"-Färbung. BUCHERER machte eine unterschiedliche Acridinorange-Konzentration pro Mikroorganismus für die verschiedenen Farben der emittierten Fluoreszenzstrahlung verantwortlich. FRANCISCO et al. (1973) verglichen die Acridinorange-Färbetheorie STRUGGERS mit dem Drop plating-Verfahren an Wasserbakterien und konnten keine Beziehung zwischen den beiden Parametern feststellen. Sie betonten jedoch die gute Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Bakterien und Plankton in ihren Proben. Der Anfärbung von Meereswasserbakterien mit Acridinorange bedienten sich noch eine Reihe anderer Autoren für quantitative Untersuchungen: ZIMMERMANN & MEYER-REIL (1974), JONES & SIMON (1975), BOWDEN (1976), HOBBIE et al. (1976), ZIMMERMANN et al. (1978), BECKER-BIRK (1979), LOY & RHEINHEIMER (1980), HARVEY & YOUNG (1980), MAKI & REMSEN (1981). ATTWELL & COLWELL (1981) benutzten die Epifluoreszenztechnik, um Reifungs- und Wachstumsprozesse bei Sporen von Thermoactinomycceten zu untersuchen, die sie ebenfalls aus Gewässern isoliert hatten.

PATON & JONES (1973) färbten Mikroorganismen direkt auf geeigneten Teilen von Fleisch, Fisch, Haut, Pflanzen und Mineralien an. Voraussetzung dafür war eine möglichst dünne und ebene Oberfläche der untersuchten Materialien, die nach Anfärbung mit dem Fluorochrom "Tinopal AN" mit einem Auflichtfluoreszenzmikroskop untersucht wurden. Sie empfahlen dieses Verfahren für Untersuchungen über die Belastung von Oberflächen mit

Bakterien. Auch HOSSEL & BAKER (1978) führten ihre Untersuchungen zum direkten Keimnachweis an Oberflächen von Pflanzenteilen durch, auf denen sie die Keime durch Anfärbung mit verschiedenen Fluorochromen für die Epifluoreszenzmikroskopie darstellbar machten. CLARKE & NAYLOR (1978) färbten Protozoen und Bakterien in Panseninhalt an und stellten die gute Differenzierbarkeit der Mikroorganismen gegenüber Pflanzenfragmenten und ähnlichen Beimengungen im Probesubstrat dar. ROSENDAL & VALDIVIESO-GARCIA (1980) verglichen die Auflichtfluoreszenzmikroskopie mit Acridinorange als Fluorochrom mit kulturellen Methoden bei der Untersuchung flüssiger Mycoplasmen-Kulturen. Sie verglichen die kulturell erzielbaren Anzahlen von Kolonien mit der Anzahl fluoreszierender Mikroorganismen und stellten eine hohe Korrelation beider Parameter bei Kulturen fest, die $\geq 10^6$ Cfu/ml in der exponentiellen Wachstumsphase enthielten. Eine Abschwächung des guten Verhältnisses trat in der stationären Phase auf. In der Absterbephase der Kulturen war kein Zusammenhang mehr ersichtlich. SPETH & NASH (1980) bedienten sich der Fluoreszenzmikroskopie, um mit den Fluorochromen "Auramin O" und "Bisbenzimid H 33258" Kernregionen in Pilzen bzw. deren Sporen und Mycelien darzustellen.

Auch für den Keimnachweis in Lebensmitteln rückte die direkte Fluorochromierung der Keime immer mehr in den Vordergrund. Während sich WINTER (1971) für seine Untersuchungen von Gemüseaufschwemmungen noch der Lichtmikroskopie bediente, um gefärbte Mikrokolonien auf Membranfiltern auszuzählen, benutzten PETTIPHER et al. (1980), PETTIPHER & RODRIGUES (1981) und BAUMGART et al. (1981) bei ihren Untersuchungen die Auflichtfluoreszenzmikroskopie. PETTIPHER et al., deren Probesubstrate Milch und Milchprodukte waren, wiesen direkt einzelne, mit Acridinorange gefärbte Keime nach, BAUMGART et al. zählten auf Membranfiltern gewachsene, fluoreszierende Mikrokolonien aus. Milch, Urin und Fleischproben untersuchten SCHOLEFIELD et al. (1976) im Epifluoreszenzmikroskop.

II.2.4.2. Aufbereitungsverfahren für die Untersuchung von Lebensmitteln mit dem Epifluoreszenzmikroskop

Die direkte Fluorochromierung von Mikroorganismen und deren quantitativer Nachweis in Lebensmitteln konfrontierte viele Autoren mit neuen Problemen bei der Aufbereitung ihrer zu untersuchenden Probesubstrate. Durch den hohen Anteil an nichtmikrobiellem Eiweiß, Detritus, Muskelfasern und anderen Beimengungen im Probesubstrat ergaben sich Schwierigkeiten durch deren gleichzeitige Mitanfärbung bei der Fluorochromierung der Bakterienzellen. Diese Tatsache führte zu vielerlei Bemühungen, die für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung nötige Reinheit der meist flüssigen Probesubstrate durch Abtrennung der Beimengungen zu erreichen.

PETTIPHER et al. (1980) und PETTIPHER & RODRIGUES (1981) verwendeten zu diesem Zweck Enzyme und oberflächenaktive Stoffe, um somatische Zellen zu lysieren. Durch den Einsatz dieser Reagenzien wird als erwünschter Nebeneffekt ein Verstopfen der feinen Filterporen mit groben Fremdpartikeln vermieden (SHARPE et al., 1978; PETTIPHER et al., 1980).

Durch Vorfiltration der flüssigen Proben über sterile Faltenfilter gelang es BAUMGART et al. (1981) ihre Untersuchungen an einem ausreichend gereinigten Substrat durchzuführen. PETTIPHER & RODRIGUES (1982) bedienten sich zu diesem Zweck sterilisierter Nylonfilter mit einer Porengröße von 5 µm.

WOOD (1980) empfahl den Einsatz von Ionenaustauschern, um die an Fleischpartikeln in Homogenisaten haftenden Keime von diesen abzulösen. Die Bakterien, die durch elektrische Anziehungskräfte an den Fleischfasern gehalten werden, sollen durch diese Art der Behandlung von ihren Anhaftungsstellen verdrängt werden und somit frei in dem flüssigen Untersuchungsmedium vorliegen (WOOD, 1980). Problematisch gestaltet sich nach dieser Behandlung die unbedingt notwendige Trennung des Ionenaustauschers von der benutzten Probenflüssigkeit. Da der Ionenaustauscher Fluorochrom adsorbiert, führt er zu einer unzulässigen Fluoreszenz der gesamten Probe, wodurch eine Differenzierung der Mikroorganismen von Detritus im mikroskopischen Bild unmöglich wird.

Auch SCHOLEFIELD et al. (1976) wiesen bei ihren Untersuchungen von Milch, Urin und Fleischproben auf die Notwendigkeit hin, über ein für die Zwecke der Epifluoreszenzmikroskopie ausreichend gereinigtes Probe-substrat zu verfügen, ohne jedoch Vorschläge für eventuelle Reinigungs-verfahren zu machen.

McKINNON & MANSELL (1981), die Ausspülproben von Milchtank-wagen untersuchten, konnten auf eine vorherige Aufbereitung ihrer Proben ver-zichten, da der Anteil störender Partikel im Substrat gering war. Sie erziel-ten gute Korrelationen zum Plattenzählverfahren.

II.2.5. Fluorochromierung und Nachweis von Mikroorganismen auf Polycarbonat-Filtermembranen

Bei den Untersuchungen von ZIMMERMANN & MEYER-REIL (1974) und ZIMMERMANN et al. (1978) bedienten sich die Autoren erstmals der Nuclepore^R-Filtermembranen, auf denen sie Mikroorganismen durch Filtration konzentriert hatten und dort mikroskopisch nachwiesen. JONES & SIMON (1975), BOWDEN (1976) und HOBBIIE et al. (1976) wiesen ebenfalls auf die Vorzüge dieser Filter hin. Durch ihre geringe Dicke (10 µm bei einer Porengröße von 0,22 µm) und ihre überaus ebene Oberfläche machen es diese Filtertypen mög-lich, Bakterien auf ihrer Oberfläche zu konzentrieren und durch Anfärbung mit einem Fluorochrom deutlich darzustellen. Die bis dahin gängigen Filter-typen, die zumeist aus Zelluloseverbindungen bestanden, können aufgrund ihrer schwammigen Struktur Bakterien in sich aufnehmen und somit ihrer Be-stimmung durch die Epifluoreszenzmikroskopie entziehen (Abb. 1 und 2).

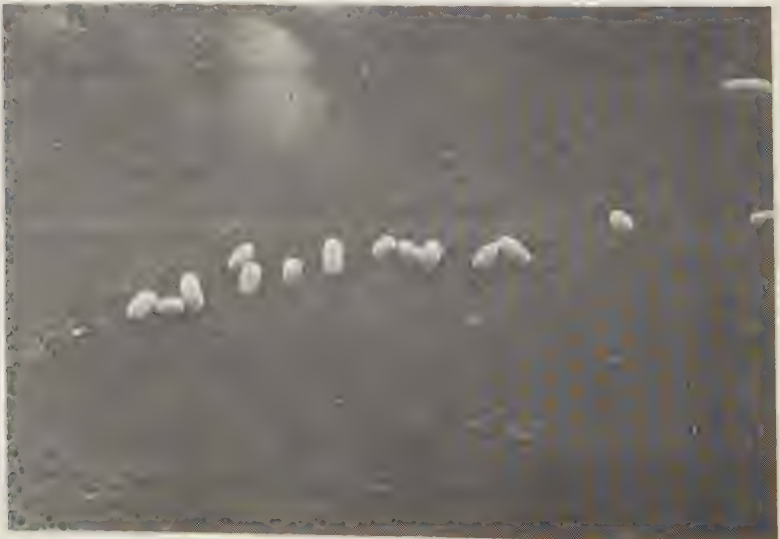
Abb. 1 (Herkunft: Dr. Katsaras, K., Kulmbach)

Millipore[®]-Membranfilter aus gemischtem Zellulose-Estern, Porengröße 0,22 μm ,
Abbildungsmaßstab 1:1500, Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme



Abb. 2

Multipore[®]-filter, 1,1 μm Porengröße, mit reinen Virus Flüssigmosaikpräparates,
Abbildungsmaßstab 1:800, Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme



II.3. Zur Differenzierbarkeit lebender von abgestorbenen Mikroorganismen mit herkömmlichen Färbemethoden der Fluoreszenzmikroskopie

Eines der größten Probleme in der fluoreszenzmikroskopischen Mikrobiologie stellt die Abgrenzungsmöglichkeit lebender von abgestorbenen Zellen dar. STRUGGER (1942) war der erste, der auf diese Möglichkeit aufgrund der unterschiedlichen Farbe emittierter Fluoreszenzstrahlung nach Anfärbung mit Acridinorange hinwies. Nach seinen Erläuterungen zeigen lebende Keime eine grüne, abgestorbene eine kupferrote und nicht mehr teilungsfähige, nekrotische eine inhomogen-grüne Fluoreszenz nach Anfärbung mit Acridinorange und blauer (470 nm) Anregungsstrahlung. Nach STRUGGERS Theorie gibt es in den abgestorbenen Mikroorganismen durch die eintretende Denaturierung des Bakterieneiweißes und dem damit verbundenen Auseinanderbrechen der DNA-Helices mehr freie Anhaftungsstellen für das Fluorochrom Acridinorange, welches durch Elektroadsorption an diese Zellelemente gebunden wird.

Diese Theorie wurde inzwischen durch viele Autoren bestritten und widerlegt. KORGAONKAR & RANADE (1965) behandelten Reinkulturen von E.coli mit verschiedenen Methoden, um die Bakterien ganz oder teilweise abzutöten. An diesen unterschiedlichen Vegetationsstadien der Keime nahmen die Autoren Färberversuche mit Acridinorange vor, die markante Unterschiede zum "Strugger-Effekt" aufzeigten. Auch BUCHERER (1965), FRANCISCO et al. (1973), JONES & SIMON (1975), HOBIE et al. (1976), ZIMMERMANN (1974), ZIMMERMANN et al. (1978) sowie BECKER-BIRK (1978 und 1979) konnten in ihren Untersuchungen nicht die von STRUGGER postulierten Zusammenhänge nachvollziehen.

HOBIE et al. (1976) stellten die Theorie auf, daß AO bei relativ niedriger Konzentration mit dem Zellmaterial von Bakterien genauso reagiert wie mit den Nucleinsäuren von Säugetierzellen. Ihrer Meinung nach zeigen sich vermehrende Bakterien eine Rotfluoreszenz, da sie durch den relativ hohen Anteil an RNA in dieser Wachstumsphase vielen Molekülen des AO die Möglichkeit bieten, mit dieser zu reagieren. Inaktive Bakterien, bei denen der Anteil an DNA in den geschlossenen Helices überwiegt, können nur wenige Moleküle AO in ihrer Kernstruktur binden und sollen deshalb grün fluoreszieren.

Grünfluoreszenz tritt nach Meinung der Autoren bei allen lebenden Bakterien auf, nur ist sie manchmal durch die Erhöhung des RNA-Anteiles in der Vermehrungsphase und der daraus resultierenden Rotfluoreszenz maskiert. Erhitzt man die Bakterien, so bricht die doppelte DNA-Helix in einfache DNA-Helices auseinander, es resultiert eine Rotfluoreszenz. Aus ihren Untersuchungen schlossen die Autoren, daß sich vermehrende und tote Bakterien eine Rotfluoreszenz zeigen. Grünfluoreszenz dagegen, die am meisten beobachtet wird, tritt bei Zellen auf, die entweder inaktiv sind oder nur **sehr langsam** wachsen. Ist sowohl eine Rot- als auch eine Grünfluoreszenz in einem Bakterium vorhanden, erscheint dieses dem Auge des Betrachters als Gelbfluoreszenz.

Aus allen diesen Untersuchungen ist ersichtlich, wie unterschiedlich die Resultate interpretiert wurden, die man durch die Fluorochromierung erreichen kann. Fügt man diesen Annahmen noch die Tatsachen hinzu, daß Acridinorange einen kathodischen Farbstoff darstellt, dessen Dissoziation in Lösungen abhängig ist von Temperatur, pH-Wert, seiner Konzentration, seiner Reinheit und von den Bestandteilen des Lösungsmittels selber, so erscheint eine reproduzierbare Aussage über die erzeugte Fluoreszenz in Zusammenhang mit der "Lebend-Tot"-Darstellung der gefärbten Mikroorganismen in den Bereich des Unmöglichen gerückt.

Um so mehr ergab sich die Notwendigkeit, eine Methode zu finden, mit der eine Aussage über den lebensfähigen Anteil einer Bakterienpopulation möglich war, ohne auf die Vorzüge der Epifluoreszenzmikroskopie verzichten zu müssen.

II.4. Abgrenzung ETS (Elektronentransportsystem)-positiver von ETS-negativen Mikroorganismen als Parameter der Vermehrungsfähigkeit der Zellen durch die Epifluoreszenzmikroskopie

Um den Anteil lebender Mikroorganismen in einem Probesubstrat schnell und zuverlässig bestimmen zu können, bedienten sich in letzter Zeit viele Autoren einer relativ einfachen Methode. Diese beruht auf dem Nachweis eines aktiven Elektronentransportsystems als Indikator einer Atmungsaktivität.

Jede atmende Zelle verfügt über ein aktives respiratorisches Elektronentransportsystem, welches die Atmung kontrolliert. Innerhalb dieser Elektronentransportkette übernehmen Dehydrogenasen den Transport von entstehenden Wasserstoffionen und übertragen ihn auf einen spezifischen Akzeptor, der dadurch reduziert wird (FIESER, LOUIS & FIESER, MARY, 1968; ZIMMERMANN et al., 1978; BECKER-BIRK, 1978).

Als Akzeptor können auch Tetrazoliumsalze fungieren, die die Eigenschaft haben, Wasserstoff an verschiedenen Stellen des Elektronentransportsystems der Zelle aufzunehmen und dadurch selbst in eine reduzierte Form übergehen. Dieser Vorgang ist mit einem Farbwechsel des Tetrazoliumsalzes verbunden. Hierbei geht dessen farblose, wasserlösliche organische Verbindung in einen farbigen, wasserunlöslichen, organischen Komplex über, das sogenannte Formazan, welches sich in die Zelle einlagert und dort mikroskopisch nachgewiesen werden kann (BECKER-BIRK, 1978 und 1979; ZIMMERMANN et al., 1978; LOY & RHEINHEIMER, 1980; HARVEY & YOUNG, 1980; CHRISTENSEN et al., 1980; MAKI & REMSEN, 1981; BITTON & KOOPMAN, 1982). Die Bildung des Formazans ist demnach abhängig von dem Vorhandensein aktiver Dehydrogenasen und von der aktiven Oxidation des Coenzym Q-Cytochrom B-Komplexes innerhalb der Atmungskette. Durch die Möglichkeit, gebildete Formazangranula mikroskopisch nachzuweisen, eröffnete sich ein neuer Weg, lebende Mikroorganismen zu identifizieren, ohne auf die zeit- und apparaturaufwendigen Methoden zurückgreifen zu müssen, die bisher praktiziert wurden.

Als besonders empfehlenswert für diesen mikroskopischen Nachweis erwies sich dabei die Anwendung der Epifluoreszenzmikroskopie. Einerseits wird bei dieser Methodik durch den Gebrauch von AO als Fluorochrom ein Farbstoff gewählt, der Mikroorganismen sehr intensiv anfärbt und sie somit gut gegen ihren Hintergrund abgrenzbar macht. Andererseits wird durch den vom Normallicht getrennten Strahlengang des anregenden Fluoreszenzlichtes, der von oben auf das Präparat fällt, (1.) das Auffinden der Zellen erleichtert, die auf einem Filter konzentriert werden (2.) die Möglichkeit offengehalten, zusätzlich mit dem Normallicht zu arbeiten, was sich z.B. bei der Darstellung der Formazangranula als sehr nützlich erweist. Erhöht man nämlich den Anteil des normalen Durchlichtes bei gleichzeitiger Anwendung des Fluoreszenzlichtes, so kann man die gebildeten Formazanprodukte besser erkennen, weil gleichzeitig die emittierte Fluoreszenzintensität der Zellen zurückgedrängt wird. So wird es möglich, zwei Parameter mit praktisch einem mikroskopischen Bild zu bestimmen: (1.) bei alleiniger Benutzung des Fluoreszenzlichtes die Bestimmung der mikroskopischen Gesamtkeimzahl (GKZ) und (2.) bei Hinzuschaltung von Durchlicht den Anteil der atmungsaktiven Keime. Eine äußerst wichtige Ergänzung dieser Methodik stellte die Einführung der Nuclepore^R-Polycarbonat Filtermembranen dar. Durch ihre beschriebenen Vorzüge wird es ermöglicht, Mikroorganismen besonders gut mit der Auflichtfluoreszenztechnik darzustellen.

III. E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

III.1. Material und Methodik

III.1.1. Versuche mit Reinkulturen

III.1.1.1. Herkunft und Ansatz der Reinkulturen

Bei der Stammauswahl wurden Bakterien berücksichtigt, die zu den typischen Vertretern der Fleischflora gehören (REUTER,1970; STRASSER,1979; LEISTNER,1981; BOLTE,1981).

Familie	Genus	Spezies	Stammbezeichnung	Herkunft, Jahr
Entero- bacteria- ceae		-E.coli	ATCC 25922	RKI, Berlin, 1972
		-Klebsiella aerogenes	K 8	RKI, Berlin, 1978
		-Enterobacter aerogenes	E 36	Pietzsch, Berlin, 1980
Pseudomo- nadaceae	Pseudo- monas	-Ps.fluorescens	665/70	ders., 1971
		-Ps.taetrolens	5/9	Kielwein,
		-Ps.spezies I	7/0	Gießen, 1978
Lactoba- cillaceae	Lacto- bacillus Strepto- coccus	-L.planta- rum I	R 43 e(a)	Reuter, Berlin, 1961
		-Sc.faecalis var.faecalis	11640	Hahn, Kiel, 1978
Micro- coccaceae	Staphylo- coccus Micro- coccus	-St.aureus	ATCC 6538	BGA, Berlin, 1972
		-Mc.luteus	CCM 169	Schleifer, München, 1979
Moraxella- Acineto- bacter- Gruppe		-Mor.non lique- faciens	CCM 5604	Beyer, Berlin, 1981
		-Acinetobacter anitratus	NCTC 7844	

Von den auf Schrägagar bei +4°C gehaltenen Stämmen wurden nach einer circa zweistündigen Aufwärmzeit bei +37°C Subkulturen mit einer Impfüse entnommen und in 5 ml geeigneten flüssigen Medien (Pepton-Hefeextrakt-Glucose- bzw. MRS-Bouillon) suspendiert. Die beimpfte Bouillon wurde bei geeigneten Temperaturen (37°C bzw. 30°C für Pseudomonadaceae) für 24 Stunden inkubiert. Nach Abzentrifugieren (3000 Upm für 20 min) und einmaliger Waschung mit 0,85% NaCl-Lösung wurde die Kultur, ebenfalls mit NaCl-Lösung, auf eine Keimdichte von circa 10^5 bis 10^6 /ml gegen die McFarland-Standardskala für Trübungsmessungen (BaSO_4 -Standard) eingestellt (nach HALLMANN, 1980). Ein ml dieser Aufschwemmung wurde anschließend in 100 ml frisches flüssiges Medium pipettiert. Mit dieser Beimpfung begann die Meßperiode für verschiedene Untersuchungszeiten. Die Inkubationstemperatur wurde wiederum artspezifisch gewählt.

Zu den angegebenen Zeiten (0,2,4,6,16,18,20,24,48,72 h) wurden jeweils 5 ml der beimpften Bouillon entnommen, zentrifugiert (3000 Upm für 20 min), der Überstand dekantiert und der Bodensatz mit 5 ml NaCl-Lösung gewaschen. Diese 5 ml der gewaschenen Kultur dienten als Verdünnungsstufe 0 und wurden mit NaCl-Pepton-Lösung (0,85% NaCl, 0,1% Casein-Pepton) in Zehnerstufen verdünnt, bis eine für das Drop plating- und das Spatel-Verfahren auszählbare Keimdichte pro ml erreicht war. Sämtliche Drop- und Spatelbestimmungen wurden als Doppelansatz durchgeführt und ausgewertet. Für die Untersuchungen nach 16, 18 und 20 h Inkubationszeit wurde die Aufschwemmung bei +4°C gelagert, und nach 6 Stunden des ersten Untersuchungstages 1 ml in ein zweites Probengefäß gegeben, welches wieder 100 ml des entsprechenden flüssigen Mediums enthielt, so daß am Morgen des darauffolgenden Tages die 16-h-Kultur-Untersuchung erfolgen konnte.

Bei der Auswertung der Platten wurden je zwei aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen (im Verhältnis 1:10) ausgezählt. Als weitere Verdünnungsstufe wurde stets diejenige ausgewertet, aus der eine noch deutlich ablesbare Anzahl an Kolonien gewachsen war (x_1) und bei der die Kolonien gut voneinander abgegrenzt waren. Die Anzahl der Kolonien der nächst höheren Verdünnungsstufe ging als zweiter Wert (x_2) in die Berechnung der Cfu ein. Die Schätzung der mittleren Keimzahl pro ml wurde nach FARMILOE et al. (1954) mit folgender Formel ermittelt:

$$\bar{x}_F = \frac{(x_1 + x_2) \cdot 10}{11}$$

III.1.1.2. Untersuchungsgang für die Epifluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchungen mit dem Epifluoreszenzmikroskop wurden die Verdünnungsstufen benutzt, deren Keimdichte bei mindestens 10^4 bis 10^5 pro ml lag. Zu 9 ml wurde 1 ml 0,2% INT-Lösung (2-Jodophenyl-3-Nitrophenyl-5-Phenyl-2 H Tetrazoliumchlorid, wässrige Lösung) gegeben und für 20 min bei Lichtausschluß und Zimmertemperatur inkubiert (ZIMMERMANN et al., 1978). Mikroorganismen mit einem aktiven Atmungssystem verstoffwechselten INT zu INT-Formazan und lagerten es innerhalb ihres Zellkörpers ab, wo es mikroskopisch in Form von Granula zu sehen war. Die Reaktion des Tetrazoliumsalses mit dem ETS der Keime wurde nach 20 min durch Zugabe von 0,2 ml Formalin 37% zur Probe gestoppt. 1 ml der fixierten Probe wurde auf ein Nuclepore^R-Filter (0,2 μ m Porengröße, 25 mm Durchmesser) gegeben, das in eine Filtrationseinheit GV025 der Firma Schleicher & Schüll gespannt war und durch Anlegen eines Vakuums von 200 mm Hg filtriert. Die Nuclepore^R-Filtermembranen waren für mindestens 18 h in alkoholische Sudanschwarz-B-Lösung (1:20.000, in 50 % Äthanol) eingelegt, um ihre eventuelle Eigenfluoreszenz zu unterdrücken (ZIMMERMANN et al., 1978). Direkt vor der Filtration wurden sie aus der Färbelösung entnommen und zweimal mit bidestilliertem Wasser abgewaschen. Nach der Filtration der Probe wurde das angelegte Vakuum aufgehoben, 1 ml Acridinorange-Lösung (1:10.000 in Phosphat-Puffer-Lösung, pH 6,8, + 2 % Formalin 37 %) auf das Filter gegeben und für 3 min gefärbt (ZIMMERMANN et al., 1978, BECKER-BIRK, 1978). Nachdem auch die Farblösung abgesaugt war, wurde das Filter aus dem Filtrationsgestell entnommen, luftgetrocknet und auf einen Objektträger gelegt, auf den nach Abflammen mit Alkohol ein Tropfen "Cargille LF"-Immersionsöl getropft wurde. Die Benutzung von "Cargille LF"-Immersionsöl empfiehlt sich, weil nach den Angaben von ZIMMERMANN et al., (1978) und BECKER-BIRK (1979) andere Immersionsöle das gebildete Formazan aus den Keimen herauslösen können. "LF" steht für "low fluorescence", d.h., daß das Öl eine sehr geringe Eigenfluoreszenz hat. Ein zweiter Tropfen des Öles wurde auf das Filter gegeben, dann ein Deckglas (24x32 mm, Nr. 1) aufgelegt und durch manuellen Druck auf den Objektträger gepreßt, bis das Filter plan war und überschüssiges Öl zur Seite entweichen konnte.

Die Filter wurden bei 1000facher Vergrößerung mit Ölimmer-
sion im Leitz Mikroskop "Dialux 20" mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung
(Ploemopak 2.4) betrachtet und ausgewertet. Durch die verwendete Blau-An-
regungsstrahlung (450-490 nm, Filterblock I 2, Fa. Leitz) in Verbindung mit
Acridinorange als Fluorochrom stellten sich die gefärbten Partikel grün bis
orangerot auf dem Filter dar. Der Aufarbeitungsgang ist in einer Übersichts-
tabelle veranschaulicht (Tab. 1).

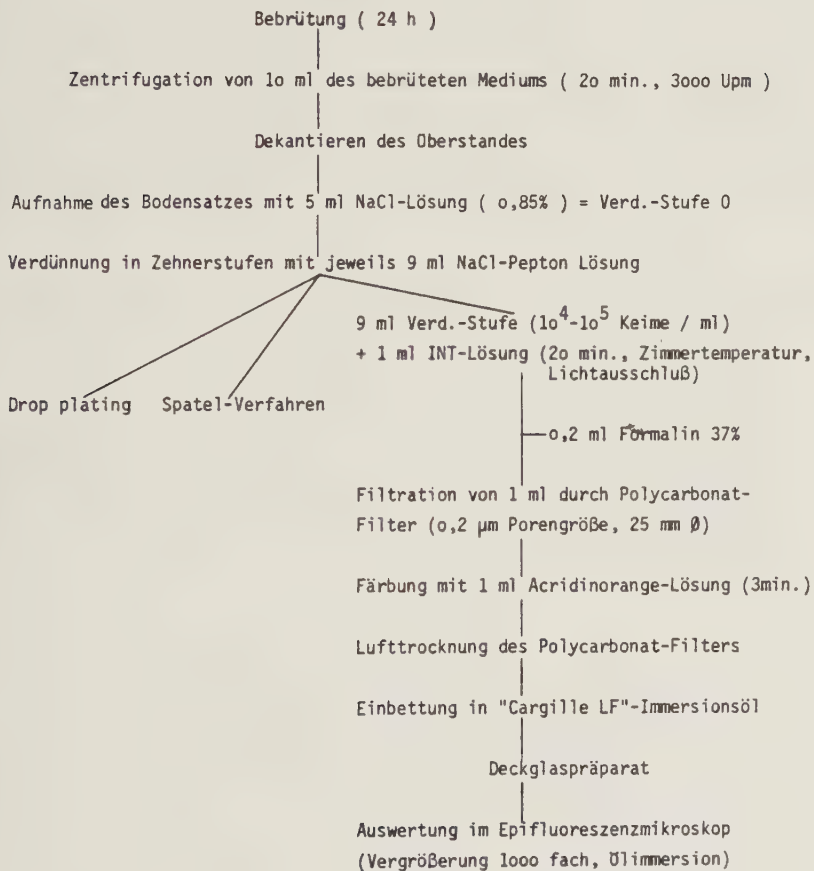
Zur Zählung der Mikroorganismen wurde ein Netzkular benutzt
(Fa. Leitz, 1 cm² in 100 Quadrate unterteilt). Das Gesichtsfeld wurde
mäanderrförmig durchgemustert. Pro Filter wurden 10 repräsentative Netzkular-
flächen ausgezählt, bei denen die Anzahl der vorhandenen Zellen in etwa der
Gesamtverteilung auf dem Filter entsprach. Dabei wurden 5 Netzteile in der
horizontalen und 5 Netzteile in der vertikalen Ebene ausgezählt.

Als Ergebnis wurde der Mittelwert der 10 ausgezählten Netz-
okularflächen angesehen, der mit dem Umrechnungsfaktor 51.611 multipliziert
werden mußte. Dieser berücksichtigte den Anteil des mikroskopischen Bildes
an der gesamten Filtrationsfläche des Nuclepore^R-Filters. Für die Bestimmung
des Umrechnungsfaktors wurden die effektive Filtrationsfläche des Filters
und die Fläche des Netzkulares bei 1000facher Vergrößerung zueinander in
Beziehung gesetzt. Die Fläche des Netzkulares wurde mit Hilfe eines Objekt-
mikrometers bestimmt und ergab eine Größe von 6084 µm². Durch die vorherige
Berechnung der effektiven Filtrationsfläche von 314.000.000 µm² ergibt sich
der Umrechnungsfaktor 51.611, wenn man sie durch die Fläche des Netzkulares
teilt.

Bei der Auszählung wurde unterschieden in Mikroorganismen,
die Formazan eingelagert hatten (ETS +) und jene, die es nicht gebildet
hatten (ETS -). Durch die Addition der beiden Werte kommt man auf die Ge-
samtkeimzahl (GKZ).

Tab. 1

Aufarbeitungsgang für die Untersuchung von Reinkulturen



III.2. Versuche mit nativen Proben (Abtrage- und Spülproben von Fleischoberflächen)

III.2.1. Probenmaterial und Probenentnahmetechnik

Das Probenmaterial (86 Abtrageproben und 91 Abspülproben) stammte von 3 bis 7 Tage alten, gekühlten Rinderschlachthälften aus einem Berliner fleischverarbeitenden Betrieb. Die Probenentnahme erfolgte am fett- und fascienfreien *M. gracilis*. Die Kerntemperatur der Schlachttierkörper lag zwischen 3° und 7°C, die Raumtemperatur der Aufbewahrungshalle betrug 2° bis 3°C. Das Fleisch wies pH-Werte zwischen 5,4 und 5,9 auf.

Für die Gewinnung der Abspülproben wurde mit dem Abspülgerät nach REUTER et al. (1979) eine 20 cm² große Fleischfläche mit 5 ml Flüssigkeit abgespült. Dafür diente NaCl-Pepton-Lösung (1 g Pepton aus Casein und 8,5 g NaCl auf 1000 ml Aq. dest.). Die Spülflüssigkeit wurde mit einer sterilen Einwegspritze in die Spülkammer eingespritzt, und der Spülvorgang durch 15maliges Aufziehen und Einspritzen wiederholt (STRASSER, 1979). Danach wurde die Abspülflüssigkeit in die Spritze zurückgesogen und von dort in sterile Reagenzgläser verbracht. Das Abspülgerät wurde vor der Wiederverwendung durch Abflammen mit Alkohol sterilisiert.

Zur Gewinnung der Abtrageproben wurde eine ebenfalls 20 cm² große Fleischfläche aus den *M. gracilis* entnommen. Hierfür diente das Abspülgerät als Schablone, dessen Öffnung der Abspülkammer 20 cm² umfaßt. Durch Aufdrücken des Gerätes auf den Muskel wurde eine gut sichtbare Fläche abgegrenzt, die mit steriler Pinzette und sterilem Skalpell circa 1 bis 2 mm tief abgetragen wurde. Die abgetragenen Fleischflächen wurden in sterilen Petrischalen gelagert.

Sowohl die Abspül- als auch die Abtrageproben wurden in Kühltaschen, in die Kühlelemente eingelegt waren, zur Weiterverarbeitung ins Labor transportiert. Proben, die nicht am Entnahmetag verarbeitet werden konnten, wurden bis zu ihrer Untersuchung bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

III.2.2. Verarbeitung der Proben zur kulturellen Keimzahlbestimmung

Die Abtrageproben wurden mit einer sterilen Schere vorzerkleinert und mit NaCl-Pepton-Lösung auf 40 ml aufgefüllt. Zur Herstellung eines Fleischhomogenisates wurden diese Aufschwemmungen in produktionssterile Plastikbeutel umgefüllt und für 1 min im Colworth "Stomacher 400" (A. J. Seward, London) zerkleinert. Das Homogenisat wurde bis zur Ausbildung zweier Phasen (eine obere, flüssige Phase und eine untere, feste Phase) in dem aufgehängten Plastikbeutel belassen. Nachdem sich die Phasen abgesetzt hatten, wurden circa 10 ml der oberen flüssigen Phase mit einer sterilen Pipette entnommen und in ein steriles Reagenzglas transferiert.

Sowohl die flüssige Phase des Fleischhomogenisates als auch die Abspülproben wurden mit einem "Whirl-Mix" der Firma Cenco, Breda, Niederlande, sorgfältig durchmischt und anschließend mit NaCl-Pepton-Lösung bis zur siebenten Verdünnungsstufe jeweils im Verhältnis 1:10 verdünnt. Zur Bestimmung der CfU in den Probesubstraten wurden je 0,05 ml im Doppelansatz nach der Drop plating-Methode (REUTER, 1970) auf sechsfach unterteilte und vorgetrocknete Lebensmittelkeimzahl-Agarplatten (Merck Nr. 10231, plus 0,1% Tween 80 = ISO-Agar) aufgetropft. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 30°C und für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur bebrütet, bevor sie abgelesen wurden.

III.2.3. Keimzahlbestimmung mit der Epifluoreszenzmikroskopie

Vor der Untersuchung mit der Epifluoreszenzmikroskopie bedarf es einer weiteren Behandlung der Proben. Sowohl die Abspülproben als auch, in noch viel stärkerem Maße, die homogenisierten Abtrageproben, enthalten Muskelpartikel und anderes organisches Material, welches zu störenden Reaktionen bei dieser Art der Untersuchung führt. Durch die Adsorption von Fluorochrom an die im Probenmaterial vorhandenen nichtmikrobiellen Beimengungen kommt es zu einer derartig starken Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz im mikroskopischen Bild, daß eine Differenzierung von Detritus zu Mikroorganismen unmöglich wird.

Um diese Störfaktoren zu eliminieren, wurden die flüssigen Probesubstrate durch Glasfaser-Vorfilter der Firma Sartorius (Typ SM 66 13400, 25 mm Ø) filtriert. Die Filterscheiben wurden in Verbindung mit dem Filtrationsgerät der gleichen Firma (Typ SM 16645) benutzt. Dieses besteht aus einer 10 ml Spritze, auf die ein Filterhalter aufgeschraubt werden kann (Luer-Lok-System), in den das Glasfaservorfilter eingelegt wird. Das gesamte System wurde mit eingelegtem Filter autoklaviert.

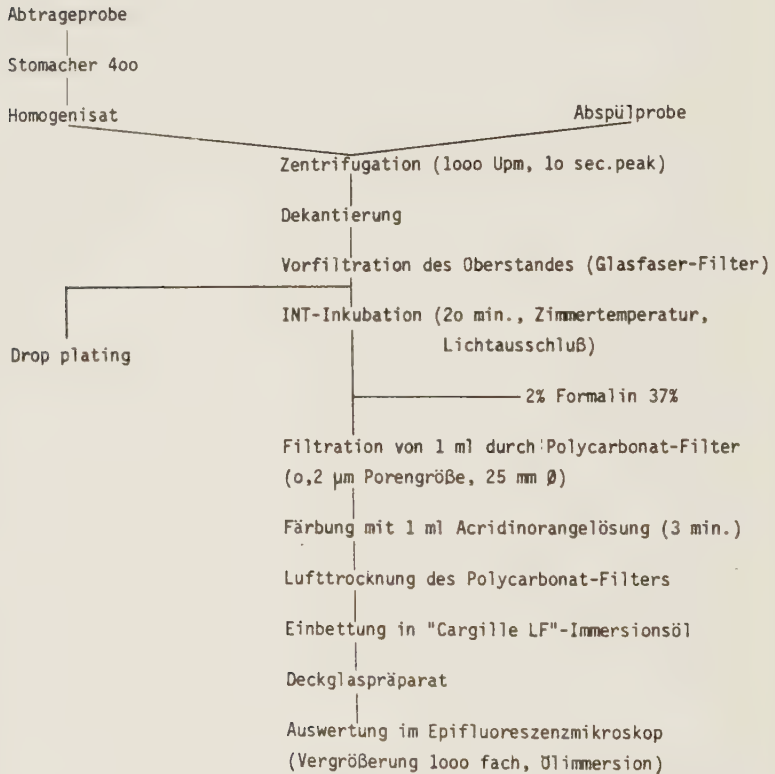
Vor der Filtration des Probesubstrates wurden 5 ml sterile 0,05 % Tween 80^R-Lösung in PPL (Phosphatpuffer-Lösung, 3,5 g KH₂PO₄, 6,0 g Na₂HPO₄·2H₂O, Aq.dest. ad 1.000,0 ml, pH 6,8) durch das Vorfilter gepreßt und dieses dadurch benetzt. Es hatte sich bei vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt, daß durch das unbehandelte Vorfilter nicht nur Fremdpartikel wie Muskelzellen, Detritus etc. weitgehend zurückgehalten wurden, sondern auch ein hoher Anteil von Mikroorganismen, der dann der quantitativen Bestimmung entgehen würde. Durch die Vorbehandlung mit dem Surfactant Tween 80^R ließ sich die Nachweisrate der Mikroorganismen im Filtrat wesentlich erhöhen. Die Retentionsrate der Glasfaservorfilter wurde durch das Drop plating-Verfahren von filtriertem und unfiltriertem Probesubstrat ermittelt. Etwa 15 min nachdem die Vorfilter benetzt worden waren, wurde das Probematerial (Abspülprobe bzw. Homogenisat) in die Spritzen aufgesogen und durch die Glasfaserfilter in sterile Reagenzröhrchen filtriert. Die Filtrate wurden mit NaCl-Pepton-Lösung bis zur siebenten Verdünnungsstufe jeweils im Verhältnis 1:10 herunterverdünnt und in Doppelbestimmungen je 0,05 ml mit dem Drop plating-Verfahren (REUTER, 1970) auf ihren Gehalt an Cfu untersucht. Als Nähragar diente wiederum das ISO-Medium.

Die Verdünnungsstufen der Filtrate dienten auch als Material für die Untersuchungen im Epifluoreszenzmikroskop. Eine Verdünnungsstufe, deren Keimgehalt bei 10⁵-10⁶ Keimen pro ml liegen sollte, wurde, wie unter III.1.1.2. für Reinkulturen beschrieben, verarbeitet und das erhaltene Nucleopore^R-Filter mikroskopisch ausgewertet. Lagen die Keimgehalte pro ml in der untersuchten Verdünnungsstufe zu hoch (oder zu niedrig), so wurde eine zweite Untersuchung notwendig, die entsprechend die nächst höhere (niedrigere) Verdünnungsstufe berücksichtigt.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden in Keimzahl pro ml angegeben, wobei wiederum die Unterscheidung in ETS(+) und ETS(-) Mikroorganismen getroffen wurde. Durch Addition beider Werte erhielt man die mikroskopische Gesamtkeimzahl pro ml. Die im Drop plating-Verfahren bestimmte Anzahl der Cfu pro ml wurde zwei Tage nach dem Probenansatz ausgewertet und mit den mikroskopischen Ergebnissen verglichen. Der Aufarbeitungsgang ist in einer Übersichtstabelle veranschaulicht (Tab. 2).

Tab. 2

Aufarbeitungsgang für die Untersuchung nativer Proben



IV. E r g e b n i s s e

IV.1. Versuche mit Reinkulturen

Ziel dieser Versuche war es, eine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen herkömmlichen quantitativen kulturellen Keimnachweismethoden (Drop plating, Spatel-Verfahren) und der mikroskopischen Epifluoreszenztechnik in Verbindung mit einem Elektronentransportsystem-Nachweis aufzuzeigen. Durch die Auswahl von 12 repräsentativen Keimen der Fleischflora als Probesubstrat sollte die Anwendbarkeit des Verfahrens für relevante Keimgruppen untersucht werden.

Die hohen Korrelationskoeffizienten, die sowohl bei dem Vergleich aller Werte des Drop plating zu ETS-positiven Mikroorganismen ($r=0,94$ mit einer Standardabweichung $s_{y \cdot x}=0,45$ Zehnerpotenzen um die Regressionsgerade) als auch bei der Gegenüberstellung Spatel-Verfahren zu ETS-positiven Mikroorganismen ($r=0,95$ mit einer Standardabweichung $s_{y \cdot x}=0,44$) erzielt wurden, weisen auf einen engen Zusammenhang der Parameter Cfu/ETS-positive Mikroorganismen hin (Abb. 3 und 4). Die Einzelbefunde sind in den Tabellen 3 bis 14 (siehe Anhang) aufgelistet, die dazugehörigen biometrischen Parameter sind in den Tabellen 15 und 16 dargestellt.

Um die bei einer Gesamtdarstellung der Ergebnisse auftretende Verzerrung der Korrelation der vergleichenden Parameter zu vermeiden, wurden sowohl die für die fünf untersuchten Familien (Abb. 5 bis 9a, siehe Anhang, Tab. 15) als auch die für die dazugehörigen zwölf Einzelkeime (Tab. 16) erzielten Werte miteinander verglichen.

IV.1.1. Vergleich der Drop plating-Werte zu der Zahl ETS-positiver Mikroorganismen

Bei der Errechnung der Korrelationskoeffizienten für die untersuchten Familien der Keime ergab sich folgendes Bild (Tab. 15):

Abb. 3: Beziehung zwischen ETS (+)-Zellen und kultureller Keimzahl Cfu (Drop plating-Verfahren) bei Reinkulturen
Gesamtdarstellung

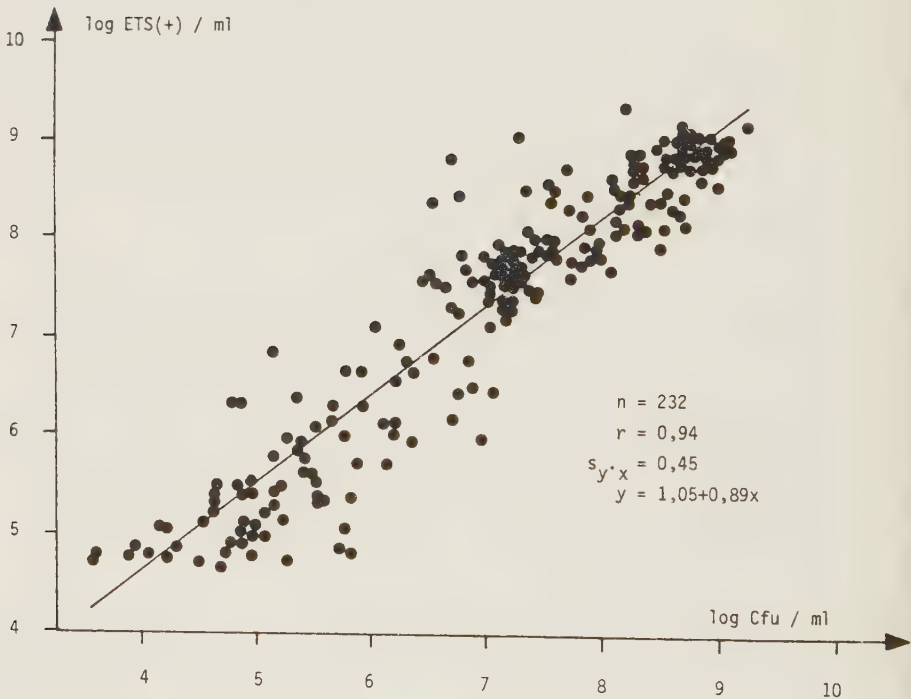
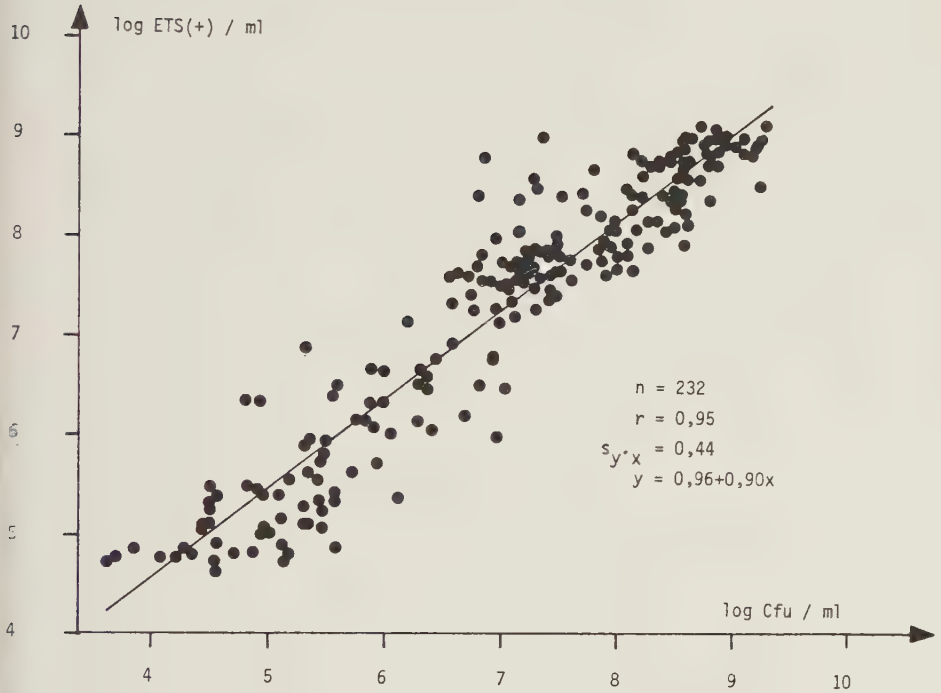


Abb. 4:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl Cf_u (Spätel-Verfahren) bei Reinkulturen
Gesamtdarstellung



Tab. 16

Statistische Daten der Korrelationen für den Vergleich kultureller Keimzählverfahren mit der mikroskopisch ermittelten Anzahl ETS-positiver Keime für die einzelnen untersuchten Mikroorganismen

Keimart	Anzahl Untersuchungen pro Verfahren	Spatel-Verfahren/ mikroskopischer ETS-Nachweis	Drop plating/ mikroskopischer ETS-Nachweis
Moraxella non liquefaciens	18	$r=0,86; s_{y \cdot x}=0,58$ $y=1,10+0,89x$	$r=0,88; s_{y \cdot x}=0,55$ $y=1,41+0,87x$
Acinetobacter anitratus	20	$r=0,89; s_{y \cdot x}=0,44$ $y=0,59+0,92x$	$r=0,89; s_{y \cdot x}=0,44$ $y=0,55+0,93x$
Lactobacillus plantarum I	20	$r=0,93; s_{y \cdot x}=0,54$ $y=1,24+0,88x$	$r=0,94; s_{y \cdot x}=0,50$ $y=1,41+0,87x$
Sc. faecalis var. faecalis	20	$r=0,97; s_{y \cdot x}=0,26$ $y=0,67+0,91x$	$r=0,98; s_{y \cdot x}=0,25$ $y=0,49+0,95x$
Pseudomonas taetrolens	20	$r=0,97; s_{y \cdot x}=0,37$ $y=0,49+1,01x$	$r=0,97; s_{y \cdot x}=0,34$ $y=0,82+0,95x$
Pseudomonas spezies I	20	$r=0,97; s_{y \cdot x}=0,38$ $y=0,71+0,97x$	$r=0,98; s_{y \cdot x}=0,30$ $y=1,03+0,92x$
Pseudomonas fluorescens	20	$r=0,98; s_{y \cdot x}=0,27$ $y=1,16+1,24x$	$r=0,97; s_{y \cdot x}=0,34$ $y=1,13+1,22x$
Micrococcus luteus	20	$r=0,95; s_{y \cdot x}=0,36$ $y=1,58+0,79x$	$r=0,93; s_{y \cdot x}=0,43$ $y=1,98+0,76x$
Staphylococcus aureus	18	$r=0,92; s_{y \cdot x}=0,49$ $y=1,70+0,82x$	$r=0,93; s_{y \cdot x}=0,46$ $y=1,67+0,84x$
Klebsiella	20	$r=0,98; s_{y \cdot x}=0,29$ $y=0,83+0,92x$	$r=0,98; s_{y \cdot x}=0,31$ $y=0,78+0,91x$
Enterobacter aerogenes	18	$r=0,92; s_{y \cdot x}=0,59$ $y=0,77+0,92x$	$r=0,91; s_{y \cdot x}=0,63$ $y=0,56+0,92x$
Escherichia coli	18	$r=0,98; s_{y \cdot x}=0,31$ $y=0,52+0,95x$	$r=0,98; s_{y \cdot x}=0,32$ $y=0,22+0,98x$

ETS : Elektronentransportsystem

r : Korrelationskoeffizient

$s_{y \cdot x}$: Residualstandardabweichung

Den besten Zusammenhang wiesen die Pseudomonadaceae und die Enterobacteriaceae mit $r=0,96$ auf, wobei die Standardabweichung um die Regressionsgerade bei den Pseudomonadaceae mit $s_{y \cdot x}=0,37$ Zehnerpotenzen geringer war, als die bei den Enterobacteriaceae ($s_{y \cdot x}=0,43$). Auch die Korrelationen der Lactobacillaceae ($r=0,95$ mit einer Standardabweichung von $s_{y \cdot x}=0,42$) und der Micrococcaceae ($r=0,92$ mit $s_{y \cdot x}=0,46$) wiesen auf einen engen Zusammenhang der Untersuchungsmethoden hin. Geringfügig schlechter war der Zusammenhang bei der Moraxella-Acinetobacter-Gruppe ($r=0,85$ mit $s_{y \cdot x}=0,53$).

Die errechneten Korrelationskoeffizienten der einzelnen untersuchten Mikroorganismen (Tab. 16) entsprachen weitestgehend dem Ergebnis der dazugehörigen Familien. Die höchsten Korrelationen wurden für *Sc. faecalis*, *Ps. spezies I*, *Klebsiella* und *E. coli* mit $r=0,98$ erzielt, wobei die Schwankung um die Regressionsgerade bei *Sc. faecalis* mit $s_{y \cdot x}=0,25$ am geringsten war, gefolgt von *Ps. spezies I* ($s_{y \cdot x}=0,30$), *Klebsiella* ($s_{y \cdot x}=0,31$) und *E. coli* ($s_{y \cdot x}=0,32$).

Für *Ps. taetrolens* und *Ps. fluorescens* errechnete sich ein Korrelationskoeffizient von $r=0,97$, die Standardabweichung um die Regressionsgerade war mit $s_{y \cdot x}=0,34$ Zehnerpotenzen in beiden Fällen gleich. Ein enger Zusammenhang wurde ebenfalls für *L. plantarum I* ($r=0,94$; $s_{y \cdot x}=0,50$), *Mc. luteus* ($r=0,93$; $s_{y \cdot x}=0,43$), *St. aureus* ($r=0,93$; $s_{y \cdot x}=0,46$) und *Enterobacter aerogenes* ($r=0,91$; $s_{y \cdot x}=0,63$) errechnet, am relativ schwächsten war die Korrelation bei den Keimen der Moraxella-Acinetobacter-Gruppe *Acinetobacter anitratus* ($r=0,89$; $s_{y \cdot x}=0,44$) und *Moraxella non liquefaciens* ($r=0,88$; $s_{y \cdot x}=0,55$).

Bei der Betrachtung der Gleichungen der Regressionsgeraden (z.B. $y=0,78+0,91x$ für *Klebsiella* im Vergleich Drop plating zu ETS-positiv) ist deren zweiter Wert von Bedeutung, der sogenannte Regressionskoeffizient b . Er gibt die Steigung der Geraden an und läßt gleichzeitig erkennen, um wieviel Zehnerpotenzen sich die Keimzahl der verglichenen Methode (in diesem Fall der ETS-positiven Keime) im Mittel erhöht, wenn bei dem angewandten Referenzverfahren (in diesem Fall das Drop plating-Verfahren, dessen Werte auf der x -Achse eingetragen sind) eine Erhöhung der Keimzahl um eine Zehnerpotenz eintritt. So ergab sich bei dem Gesamtvergleich aller Werte der Rein-

kulturen (Abb. 3) eine Steigung von $b=0,89$, d.h., eine Zunahme von durchschnittlich 0,89 Stufen der Zehnerpotenz bei dem mikroskopischen Verfahren war mit einer Zunahme von einer Zehnerpotenz beim Drop plating-Verfahren verbunden. Nach Familien (Tab. 15) aufgetrennt, ergab sich folgendes Bild: bei den Pseudomonadaceae betrug $b=0,99$, bei den Enterobacteriaceae $b=0,94$, für die Lactobacillaceae errechnete sich $b=0,88$, für die Moraxella-Acinetobacter-Gruppe $b=0,83$, für die Micrococcaceae betrug $b=0,80$.

Die Steigung der Regressionsgeraden schwankte bei den Werten für die einzelnen Keime (Tab. 16) von $b=1,22$ für *Ps. fluorescens* bis $b=0,76$ für *Mc. luteus*. Für *E. coli* war $b=0,98$, bei *Ps. taetrolens* und *Sc. faecalis* ergab $b=0,95$, *Acinetobacter anitratus* hatte eine Steigung von $b=0,93$, *Ps. spezies I* und *Enterobacter aerogenes* wiesen beide 0,92 für b auf. *Klebsiella* hatte ein b von 0,91, für *Moraxella non liquefaciens* und *L. planctum I* wurde b mit 0,87 errechnet, für *St. aureus* betrug $b=0,84$.

IV.1.2. Vergleich der im Spatel-Verfahren erzielten Werte zur Zahl ETS-positiver Mikroorganismen

Der Vergleich des Spatel-Verfahrens mit dem mikroskopischen Keimnachweisverfahren verlief nahezu identisch mit dem Vergleich der Drop plating-Werte zur Anzahl ETS-positiver Keime (Tab. 15). Dies läßt auf einen erwartungsgemäß engen Zusammenhang der kulturellen Keimnachweismethoden schließen.

Auch hier ergab die errechnete Korrelation die höchsten Werte für die Familien der Pseudomonadaceae und der Enterobacteriaceae mit $r=0,96$, wobei sich die Standardabweichung um die Regressionsgerade mit $s_{y \cdot x}=0,36$ für die Pseudomonadaceae besser darstellte als für die Enterobacteriaceae ($s_{y \cdot x}=0,40$). Eine Erhöhung der Keimzahl pro ml um eine Zehnerpotenz im Spatelverfahren ging bei den Pseudomonadaceae mit einer durchschnittlichen Erhöhung von 1,04 Zehnerpotenzen im mikroskopischen Verfahren einher, bei den Enterobacteriaceae mit 0,93 Zehnerpotenzen. Die Korrelation betrug bei den Lactobacillaceae $r=0,94$ ($s_{y \cdot x}=0,44$) mit einem Regressionskoeffizienten

von $b=0,87$, bei der Familie der Micrococcaceae war $r=0,93$ ($s_{y \cdot x}=0,44$) und die Erhöhung der mikroskopisch ermittelten Keimzahl atmender Mikroorganismen pro ml betrug im Mittel 0,81 Zehnerpotenzen für eine Zehnerpotenz im Spatel-Verfahren. Am relativ schwächsten war der Zusammenhang wiederum bei der Moraxella-Acinetobacter-Gruppe mit $r=0,86$ ($s_{y \cdot x}=0,51$) und einer Steigung der Regressionsgeraden von $b=0,88$).

Die für die einzelnen Keime ermittelten Korrelationen (Tab. 16) lagen zwischen $r=0,98$ für *Ps. fluorescens* ($s_{y \cdot x}=0,27$; $b=1,24$), *Klebsiella* ($s_{y \cdot x}=0,29$; $b=0,92$), *E. coli* ($s_{y \cdot x}=0,31$; $b=0,95$) und $r=0,86$ für *Moraxella non liquefaciens* mit einer Standardabweichung von $s_{y \cdot x}=0,58$ und einem Regressionskoeffizienten von $b=0,89$. Auch *Acinetobacter anitratus* ließ mit $r=0,89$ ($s_{y \cdot x}=0,44$; $b=0,92$) einen schwächeren Zusammenhang erkennen als die übrigen Mikroorganismen. So betrug $r=0,97$ für *Sc. faecalis* ($s_{y \cdot x}=0,26$; $b=1,01$) und für *Ps. spezie I* mit $s_{y \cdot x}=0,38$ und $b=0,97$. *Mc. luteus* ($r=0,95$ mit einer Standardabweichung von $s_{y \cdot x}=0,36$ und $b=0,79$), *L. plantarum I* ($r=0,93$; $s_{y \cdot x}=0,54$ und $b=0,88$), *St. aureus* ($r=0,92$; $s_{y \cdot x}=0,49$; $b=0,82$) und *Enterobacter aerogenes* ($r=0,92$; $s_{y \cdot x}=0,59$; $b=0,92$) zeigten wiederum enge Korrelationen auf. Die Standardabweichung der Einzelwerte um die Regressionsgerade war bei *Sc. faecalis* mit $s_{y \cdot x}=0,26$ am geringsten, bei *Enterobacter aerogenes* mit $s_{y \cdot x}=0,59$ Zehnerpotenzen am höchsten.

IV.1.3. Vergleich Drop plating/ETS-positive Mikroorganismen zu Spatel-Verfahren/ETS-positive Mikroorganismen

Wie aus den Abbildungen 3 und 4 für die Gesamtdarstellung sowie aus den Tabellen 15 und 16 für die Familien bzw. deren einzelne Keime zu entnehmen ist, besteht zwischen den Verhältnissen der beiden kulturellen Verfahren und dem mikroskopischen Verfahren kein signifikanter Unterschied. Da stets derselbe mikroskopisch ermittelte Keimgehalt an atmenden Mikroorganismen pro ml Substrat zu den beiden entsprechenden kulturell erzielten Anzahlen Cfu pro ml in Bezug gesetzt wurde, kann aufgrund der nahezu identischen Ergebnisse davon ausgegangen werden, daß das Drop plating-Verfahren in seiner Genauigkeit dem Spatel-Verfahren ebenbürtig ist.

IV.1.4. Zusammenhang zwischen der mikroskopisch ermittelten Anzahl atmender Mikroorganismen und der mikroskopischen Gesamtkeimzahl

Der Vergleich dieser beiden in einem Untersuchungsgang simultan ermittelten Parameter zeigte einen sehr engen Zusammenhang auf. Der Korrelationskoeffizient von $r=0,99$ für die Gesamtdarstellung ($s_{y \cdot x}=0,23$) veranschaulicht diese Tatsache (Abb. 10). Auch der Vergleich innerhalb der einzelnen Familien lieferte ähnliche Resultate. Ein Korrelationskoeffizient von $r=0,99$ wurde bei den Pseudomonadaceae ($s_{y \cdot x}=0,18$), den Micrococcaceae ($s_{y \cdot x}=0,13$) und den Enterobacteriaceae ($s_{y \cdot x}=0,21$) ermittelt. Fast identisch waren die Ergebnisse für die Lactobacillaceae mit $r=0,98$ ($s_{y \cdot x}=0,24$) sowie für die Moraxella-Acinetobacter-Gruppe mit $r=0,97$ und einer Standardabweichung von $s_{y \cdot x}=0,25$ (Tab. 17).

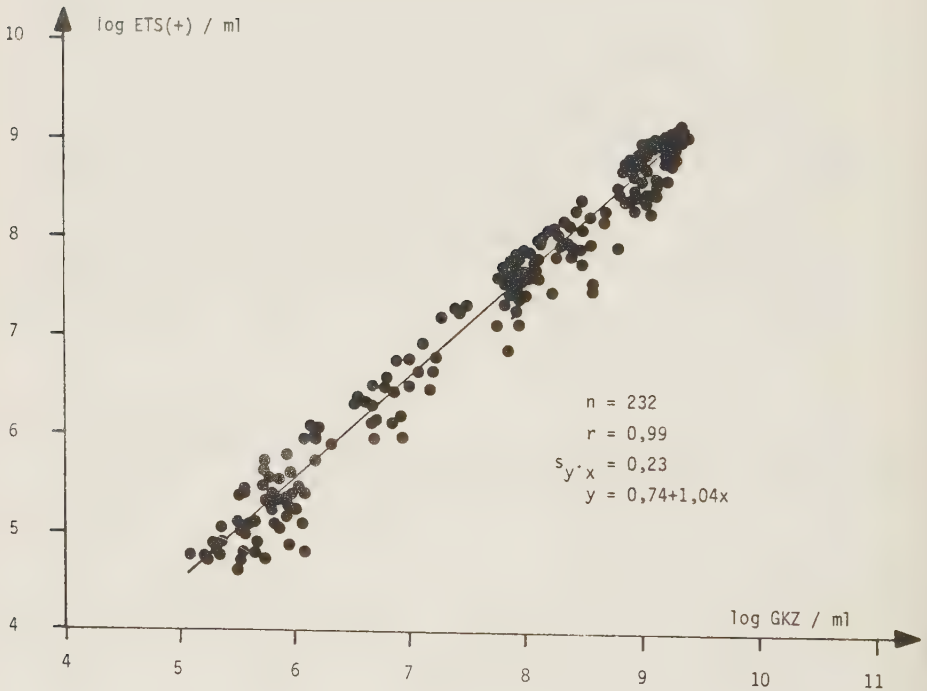
IV.1.5. Prozentualer Anteil ETS-positiver Mikroorganismen an der mikroskopisch ermittelten Gesamtkeimzahl

Um zu ermitteln, ob der prozentuale Anteil der atmenden Mikroorganismen einer Kultur ähnlichen Gesetzmäßigkeiten unterliegt, wie sie für die Fähigkeit, Kolonien zu bilden, existieren, wurde der Quotient ETS-positiv/mikroskopische Gesamtkeimzahl gebildet und in Relation zu dem Alter der Kultur gesetzt. Die errechneten Quotienten wurden graphisch gegen die Zeit (Bebrütungsdauer der Kultur) aufgetragen. Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil der ETS-positiven Keime an der mikroskopisch ermittelten Gesamtkeimzahl aufgetragen, auf der x-Achse die Bebrütungsdauer in Stunden, wie sie unter III.1.1.1. dargestellt wurde (0-48 bzw. 72 h). In den Abbildungen 11 und 12 sind exemplarisch die Werte für die Familien der Pseudomonadaceae (Abb. 11) und der Micrococcaceae (Abb. 12) dargestellt.

Die Abbildung 11 entspricht weitestgehend einer Wachstumskurve, wie sie für Mikroorganismen, die kulturell bestimmt werden, bekannt ist. Es läßt sich somit aussagen, daß die atmenden Keime dieser Probe sich in ihrer Vermehrungs- und Absterbedynamik genauso verhalten wie bei der kul-

Abb.10:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und mikroskopisch ermittelter Gesamtkeimzahl (GKZ) bei 12 Keimen verschiedener Familien



Tab.17

Statistische Daten der Korrelation der mikroskopisch bestimmten Gesamtkeimzahl zu der Anzahl ETS-positiver Mikroorganismen gegliedert nach den Familien der untersuchten Reinkulturen

Familie	Anzahl der Einzelwerte	Korrelation mikroskopische GKZ / ETS-positiv
Moraxella-Acinetobacter-Gruppe	38	$r=0,97$ $s_{y \cdot x}=0,25$ $y=0,35+0,98x$
Lactobacillaceae	40	$r=0,98$ $s_{y \cdot x}=0,24$ $y=0,17+0,93x$
Pseudomonadaceae	60	$r=0,99$ $s_{y \cdot x}=0,18$ $y=1,61+1,17x$
Micrococcaceae	38	$r=0,99$ $s_{y \cdot x}=0,13$ $y=0,04+0,96x$
Enterobacteriaceae	56	$r=0,99$ $s_{y \cdot x}=0,21$ $y=0,90+1,07x$

GKZ : Gesamtkeimzahl

ETS : Elektronentransportsystem

r : Korrelationskoeffizient

$s_{y \cdot x}$: Residualstandardabweichung (Standardabweichung um die Regressionsgerade in Zehnerpotenzen)

Abb.11:

Prozentualer Anteil ETS(+)-Zellen an der mikroskopischen Gesamtkeimzahl (GKZ) in Abhängigkeit vom Alter der Kultur bei 3 *Pseudomonas*-Stämmen

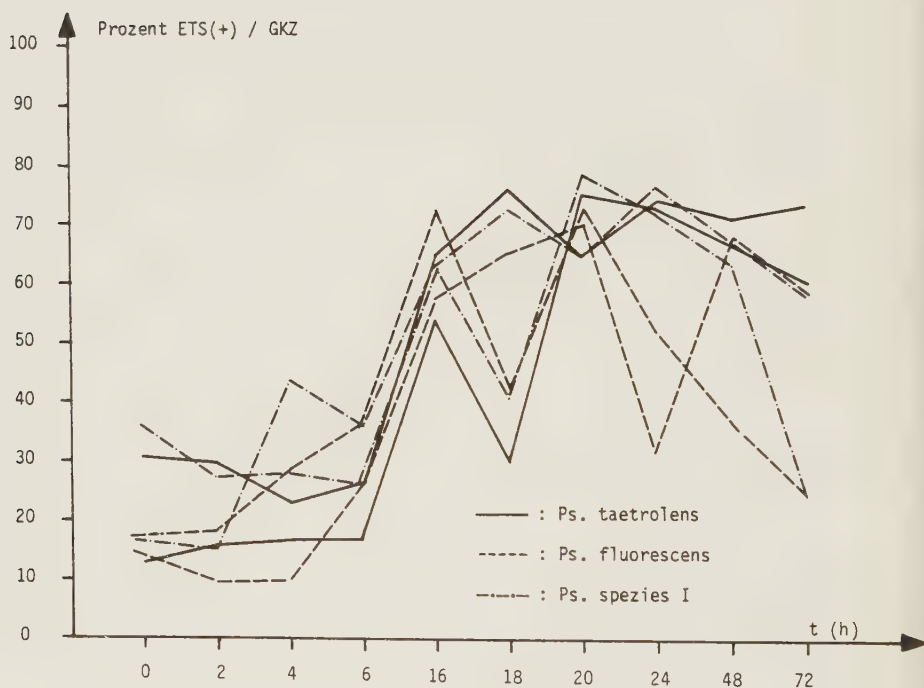
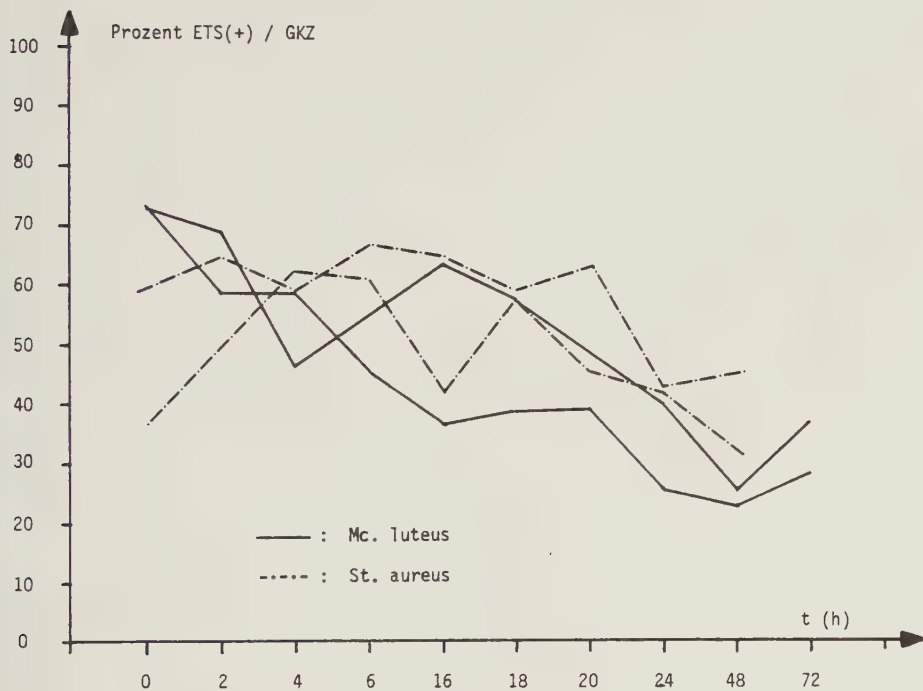


Abb.12: Prozentualer Anteil ETS(+)-Zellen an der mikroskopischen Gesamtkeimzahl (GKZ) in Abhängigkeit vom Alter der Kultur bei 2 Micrococcaceae-Stämmen



turell bestimmbarer Fähigkeit, Kolonien zu bilden. Aus dieser Tatsache resultiert die Erkennbarkeit der lag-, log- und der stationären bzw. Absterbephase der Kultur auch anhand des Quotienten $ETS(+)/\text{mikroskopische Gesamtkeimzahl}$.

Die in Abb. 12 dargestellten Quotienten für die Familien der Micrococcaceae zeigten in ihrem Verlauf ein deutlich anderes Verhalten als die Pseudomonadaceae. Der Grund hierfür liegt in den hohen Anteilen ETS-positiver Mikroorganismen an der mikroskopischen Gesamtkeimzahl zu Beginn der Untersuchung bei drei der vier Versuchsreihen der Keime. Dies deutet darauf hin, daß die Untersuchung der Kulturen in drei Fällen zu einem Zeitpunkt begonnen wurden, als die Bakterien sich auf dem Gipfel der logarithmischen Vermehrungsphase respektive am Anfang der stationären oder der Absterbephase befanden. Dies würde den hohen Ausgangsanteil von 60-75% ETS-positiven Mikroorganismen an der Gesamtkeimzahl erklären, der dann in den drei Versuchsreihen auf einen Anteil von 30-40% zurückgeht. Eine Versuchsreihe zeigte wiederum den typischen Kurvenverlauf mit einem Ausgangsanteil von ca. 35% ETS-positiven Keimen, der nach einem Anstieg auf ungefähr 63% wieder auf knapp über 30% abfällt.

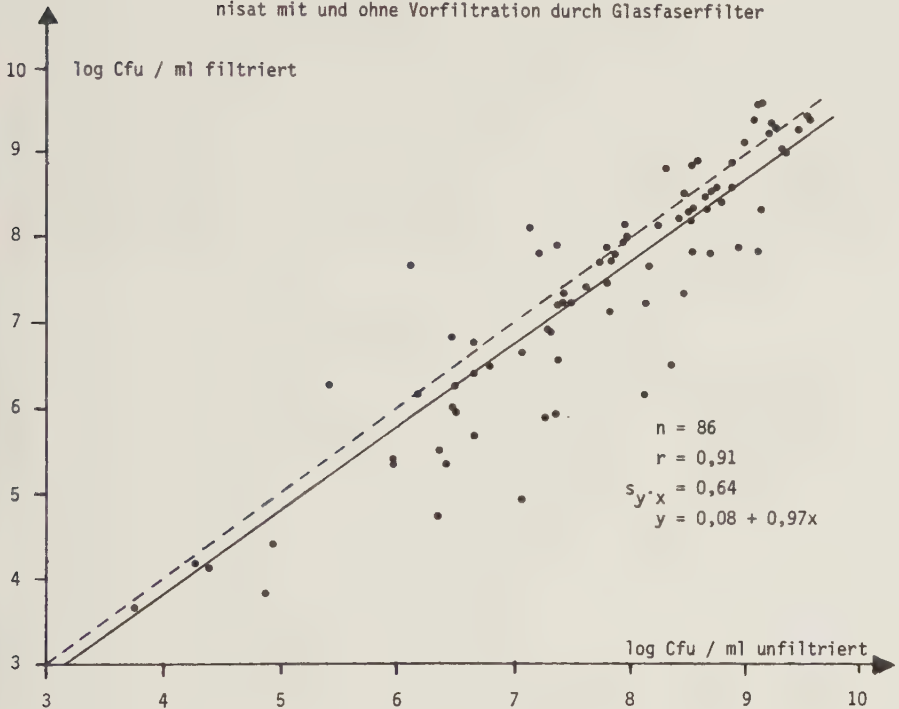
IV.2. Keimzahlbestimmung in Abtrageproben

IV.2.1. Einfluß des Vorfiltrierens auf die Keimzahlausbeute beim Epifluoreszenzverfahren

Im Gegensatz zur kulturellen Keimzahlbestimmung war bei der Epifluoreszenztechnik eine Vorbehandlung der Proben zur Beseitigung von organischen Begleitstoffen unerlässlich. Die zur Reinigung der Proben angewandte Vorfiltration durch Glasfaserfilter hielt einen mehr oder minder großen Anteil an Keimen zurück, der somit seiner quantitativen Bestimmung entging. Das Verhältnis der Cfu pro ml in filtrierten zu unfiltrierten Proben ist in Abb. 13 für die Abtrageproben dargestellt. Die Steigung der Regressionsgeraden von nahezu 1 läßt eine vergleichbare Struktur über alle Keimzahlbereiche hinweg erkennen. Die Standardabweichung ist mit $s_{y \cdot x} = 0,64$ Zehnerpotenzen relativ groß.

Abb.13:

Beziehung zwischen den kulturellen Keimzahlen (Cfu)
von Abtrageproben von Fleischoberflächen pro ml Homoge-
nisat mit und ohne Vorfiltration durch Glasfaserfilter



Die unterbrochene Linie stellt die sogenannte 45°-Gerade dar, die sich im Idealfall für im Mittel übereinstimmende Einzelwerte als Regressionsgerade ergeben würde

IV.2.2. Vergleich der Drop plating-Werte zur Zahl ETS-positiver Mikroorganismen

Die bei der Untersuchung der 86 Abtrageproben erzielten Werte sind in den Tabellen 18 bis 20 (siehe Anhang) aufgelistet. Der Zusammenhang der kulturell bestimmbaren Anzahl an CfU pro ml mit der mikroskopisch ermittelten Menge an atmenden Mikroorganismen ist in Abb. 14 graphisch dargestellt. Der Korrelationskoeffizient von $r=0,92$ zeigt die gute Übereinstimmung der beiden Untersuchungsmethoden an. Die Residualstandardabweichung um die Regressionsgerade betrug $s_{y \cdot x}=0,45$ Zehnerpotenzen. Eine Erhöhung der CfU pro ml um eine Zehnerpotenz im Probesubstrat war mit einer Erhöhung der Anzahl ETS-positiver Zellen um 0,69 Zehnerpotenzen verbunden.

In Anlehnung an die Empfehlung von LEISTNER et al. (1981) wurden die bei den Abtrageproben erzielten Ergebnisse in drei Gruppen gegliedert (Abb. 15): in der ersten Gruppe wurden alle Proben erfaßt, die im Drop plating-Verfahren einen CfU-Gehalt von $\leq 5 \times 10^6$ /ml aufwiesen ($n=27$). Die zweite Gruppe enthielt sämtliche Werte mit einem kulturell nachweisbaren Koloniegehalt von 5×10^6 bis 5×10^7 pro ml ($n=14$) und in der letzten Gruppe wurden alle Werte zusammengefaßt, die über dieser Grenze von 5×10^7 CfU/ml lagen ($n=45$). Die errechnete Korrelation betrug für die erste Gruppe ($\leq 5 \times 10^6$ CfU/ml) $r=0,67$ mit einer Residualstandardabweichung $s_{y \cdot x}=0,32$ Zehnerpotenzen, der Regressionskoeffizient war $b=0,27$. In der zweiten Gruppe (5×10^6 - 5×10^7 CfU/ml) betrug die Korrelation $r=0,63$ ($s_{y \cdot x}=0,43$) mit einem b von 1,29. Die in der dritten Gruppe ($> 5 \times 10^7$ CfU/ml) errechnete Korrelation betrug $r=0,78$ ($s_{y \cdot x}=0,38$) die Steigung der Regressionsgeraden war $b=0,79$.

IV.2.2.1. Zusammenhang zwischen mikroskopisch ermittelter Gesamtkeimzahl und ETS-positiven Mikroorganismen

Die Charakterisierung der untersuchten Fleischhomogenisate nach den genannten Gesichtspunkten wurde in ein und demselben mikroskopischen Bild simultan vorgenommen. Ihre errechnete Übereinstimmung ist in Abb. 16 graphisch dargestellt. Die hohe Korrelation von $r=0,99$ mit der geringen

Abb. 14:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keim-
Zahl CfU bei Abtrageproben von Fleischoberflächen pro
ml Homogenisat

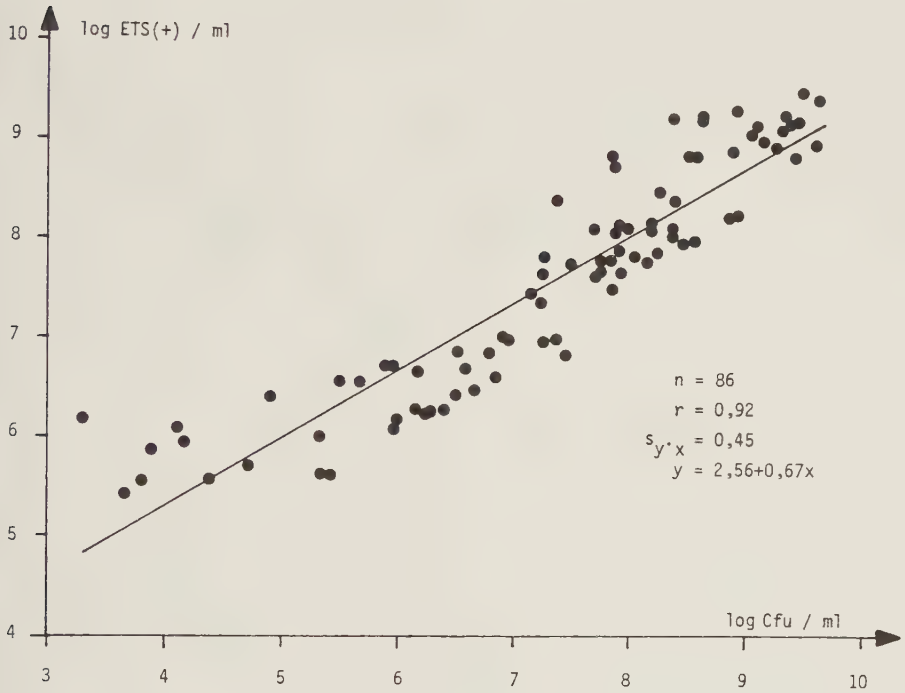
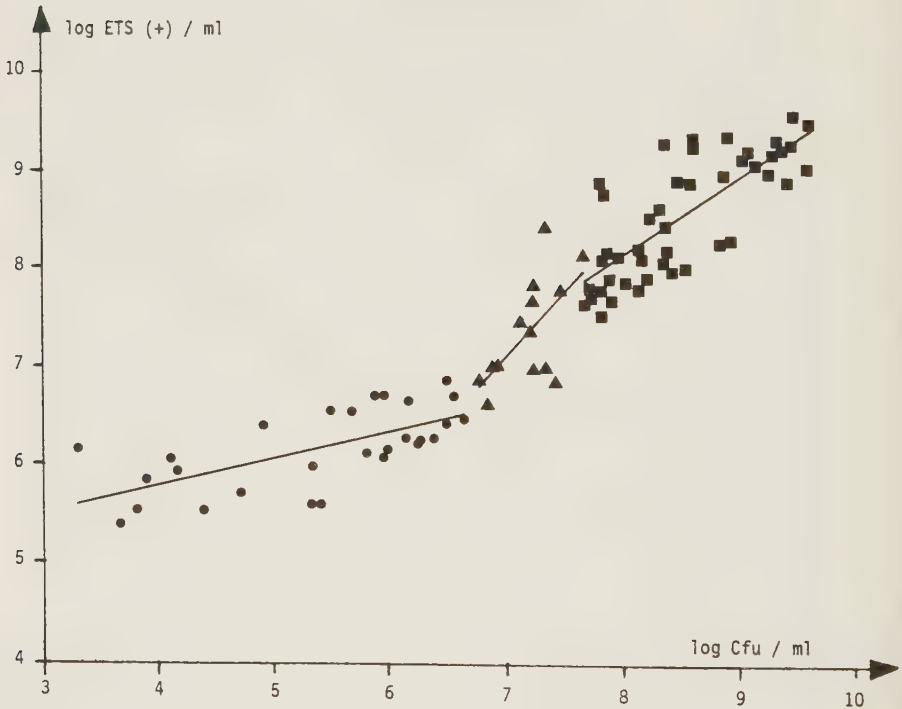


Abb.15:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl CfU bei Abtrageproben von Fleischoberflächen, unterteilt in 3 Keimzahlbereiche nach steigender CfU-Zahl/ml Homogenisat: (1) ●: $\leq 5 \times 10^6$; (2) ▲: $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$; (3) ■: $> 5 \times 10^7$



Statistische Daten der einzelnen Keimzahlbereiche:

(1) n= 27

r= 0,67

$s_{y \cdot x} = 0,32$

$y = 4,73 + 0,27x$

(2) n= 14

r= 0,63

$s_{y \cdot x} = 0,43$

$y = 1,79 + 1,29x$

(3) n= 45

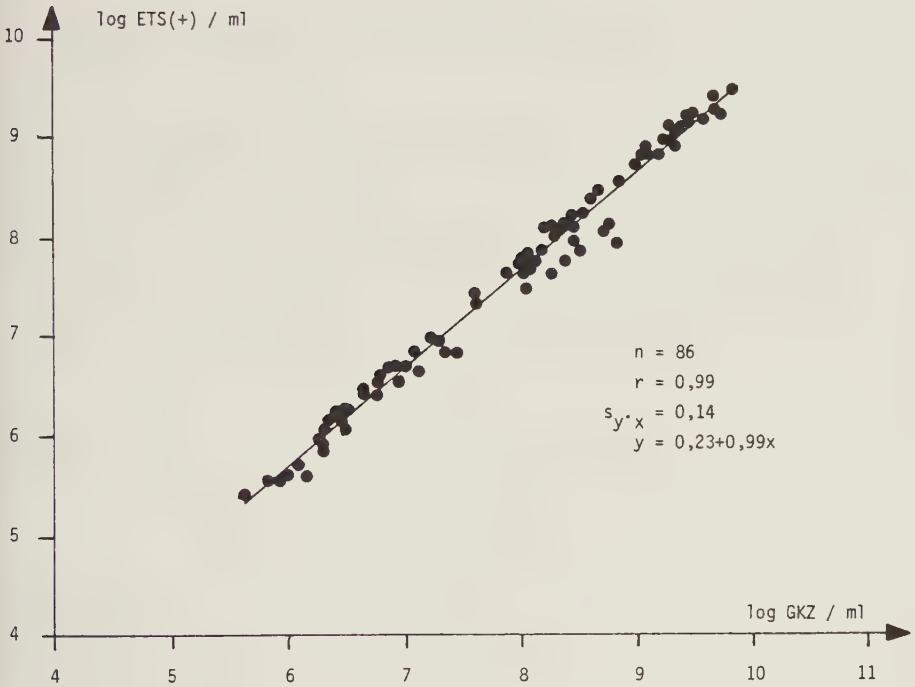
r= 0,78

$s_{y \cdot x} = 0,38$

$y = 1,79 + 0,79x$

Abb.16:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und mikroskopischer Gesamtkeimzahl (GKZ) bei Abtrageproben von Fleischoberflächen pro ml Homogenisat



Residualstandardabweichung von $s_{y \cdot x} = 0,14$ Zehnerpotenzen bei einer Steigung der Regressionsgeraden von $b = 0,99$ sprechen für den konstant hohen Zusammenhang über alle Keimzahlbereiche hinweg.

IV.2.2.2. Vergleich der Drop plating-Werte zu mikroskopischer Gesamtkeimzahl

Die unter IV.2.2.1. dargestellten Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß der Vergleich Cfu mit mikroskopischer Gesamtkeimzahl ähnliche Zusammenhänge aufzeigen würde wie der Vergleich Cfu mit ETS-positiven Mikroorganismen. Die in Abb. 17 dargestellten Korrelationen bestätigten diese Annahme; der errechnete Korrelationskoeffizient von $r = 0,92$ ($s_{y \cdot x} = 0,45$) und der Regressionskoeffizient von $b = 0,69$ waren identisch mit den im Vergleich Cfu - ETS-positive Mikroorganismen errechneten Zusammenhängen.

IV.3. Keimzahlbestimmung in Abspülproben

IV.3.1. Einfluß des Vorfiltrierens auf die Keimzahlausbeute beim Epifluoreszenzverfahren

Trotz der wesentlich geringeren Belastung der Abspülproben mit Verunreinigungen mußten sie vor ihrer Auswertung im Epifluoreszenzmikroskop ebenfalls einer Vorfiltration über Glasfaserfilter unterzogen werden. Es resultierte eine ausreichend gereinigte Probe, die eine gute Identifizierbarkeit der Mikroorganismen vor ihrem Hintergrund im fluoreszenzmikroskopischen Bild zuließ. Auch für die Vorreinigung der Abspülproben wurde das Verhältnis an Cfu/ml unfiltrierter zu filtrierter Probe gebildet und im Drop plating-Verfahren bestimmt. Das Ergebnis dieses Vergleiches ist der Abb. 18 zu entnehmen. Die Steigung der Regressionsgeraden mit fast 1 läßt wiederum eine gleichförmige Verteilung der Resultate erkennen. Die Standardabweichung ist mit $s_{y \cdot x} = 0,51$ Zehnerpotenzen etwas geringer als bei den Abtrageproben.

Abb.17:

Beziehung zwischen mikroskopischer Gesamtkeimzahl (GKZ) und kultureller Keimzahl CfU bei Abtrageproben von Fleischoberflächen pro ml Homogenisat

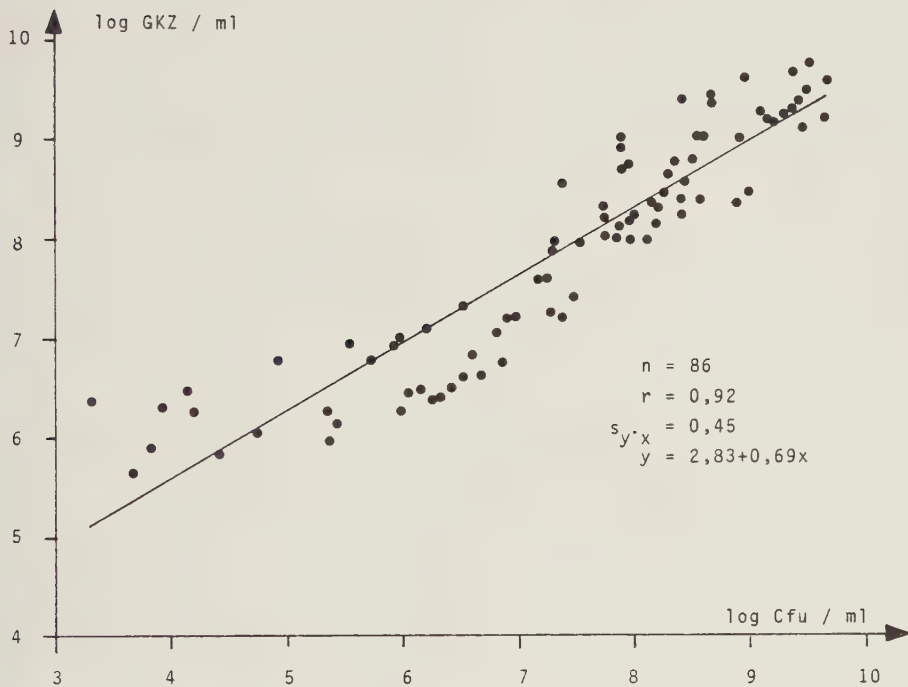
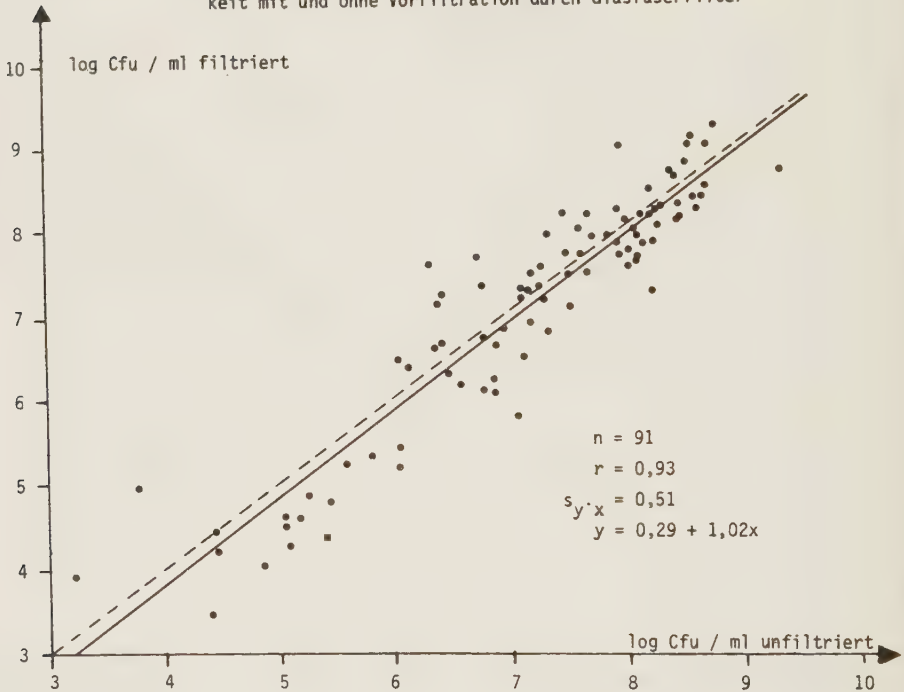


Abb.18:

Beziehung zwischen den kulturellen Keimzahlen (Cfu) von Abspülproben von Fleischoberflächen pro ml Spülflüssigkeit mit und ohne Vorfiltration durch Glasfaserfilter



Die unterbrochene Linie stellt die sogenannte 45°-Gerade dar, die sich im Idealfall für im Mittel übereinstimmende Einzelwerte als Regressionsgerade ergeben würde

IV.3.2. Vergleich der Drop plating-Werte zur Anzahl ETS-positiver Mikroorganismen

Die Untersuchungsergebnisse der 91 Abspülproben sind in den Tabellen 21-24 (siehe Anhang) aufgelistet. In Abb. 19 ist für alle untersuchten Proben der Zusammenhang der kulturell erzielten Anzahl Cfu mit der Anzahl ETS-positiver Keime pro ml Probesubstrat graphisch dargestellt. Der Korrelationskoeffizient $r=0,92$ ($s_{y \cdot x}=0,42$) deutet auf eine gute Übereinstimmung der verglichenen Kriterien hin. Die Steigung der Regressionsgeraden war $b=0,69$.

Bei der Betrachtung der Korrelationen nach Unterteilung der Keimzahlbereiche in drei Gruppen, wie für die Abtrageproben beschrieben, ließ sich gut erkennen, daß mit steigender Keimzahl (Cfu-Zahl) der Proben eine bessere Übereinstimmung der verglichenen Parameter einhergeht (Abb. 20). So betrug der Korrelationskoeffizient für die Gruppe 1 ($\leq 5 \times 10^6$ Cfu/ml, $n=29$) $r=0,58$ ($s_{y \cdot x}=0,51$ Zehnerpotenzen, $b=0,37$) und zeigte somit einen schwachen Zusammenhang auf. In der mittleren Gruppe ($5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ Cfu/ml, $n=23$) war $r=0,77$, die Residualstandardabweichung betrug nur noch $s_{y \cdot x}=0,28$ Zehnerpotenzen, die Steigung der Regressionsgeraden war $b=1,18$. Die für die dritte Gruppe ermittelte Korrelation fand ihren Ausdruck in $r=0,82$ mit einer Standardabweichung von $s_{y \cdot x}=0,24$ Zehnerpotenzen, eine Zunahme der Anzahl der Cfu pro ml um eine Zehnerpotenz war mit einer Erhöhung der Anzahl ETS-positiver Mikroorganismen von 0,85 Zehnerpotenzen verbunden, n betrug 39.

IV.3.2.1. Zusammenhang zwischen mikroskopisch ermittelter Gesamtkeimzahl und ETS-positiven Mikroorganismen

Die Auswertung dieser Ergebnisse erbrachte, wie bei den Abtrageproben, eine hohe Übereinstimmung mit $r=0,99$ als Korrelationskoeffizient. Die Standardabweichung um die Regressionsgerade betrug lediglich 0,12 Zehnerpotenzen, die Steigung der Regressionsgeraden war $b=0,99$. Auch bei den Abspülproben erstreckte sich die gute Korrelation gleichmäßig über den gesamten Keimzahlbereich (Abb. 21).

Abb.19:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl CfU bei Abspülproben von Fleischoberflächen pro ml Spülflüssigkeit

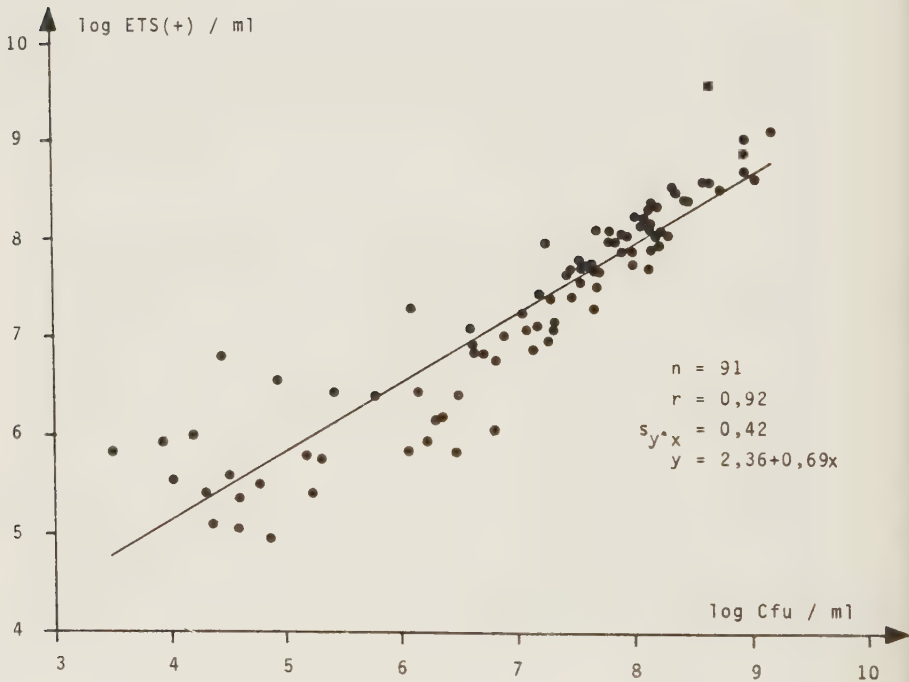
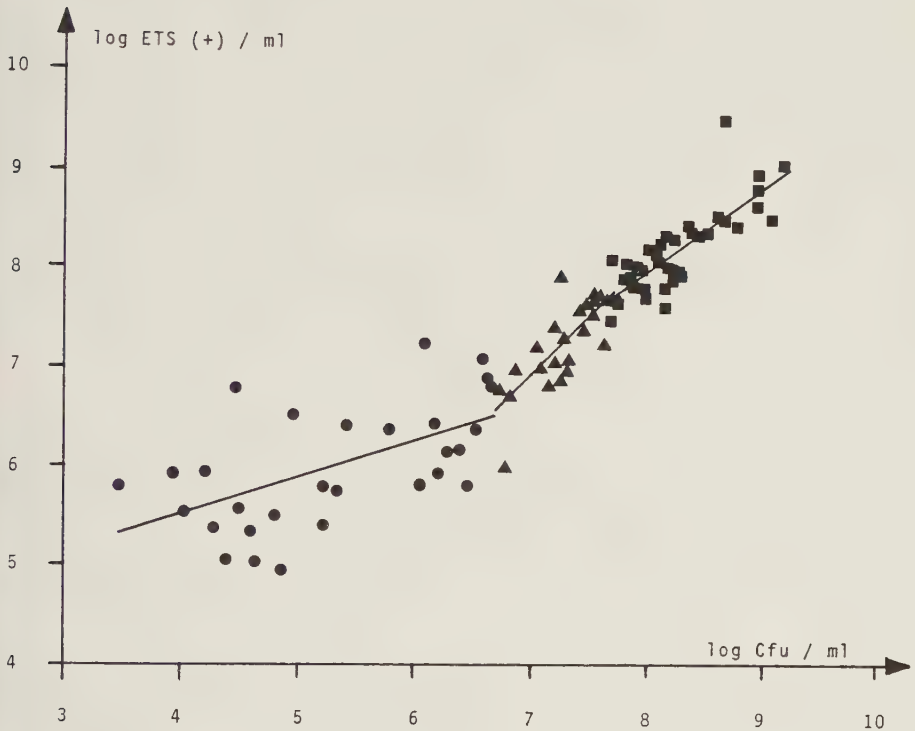


Abb.20:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl Cfu bei Abspülproben von Fleischoberflächen, unterteilt in 3 Keimzahlbereiche nach steigender Cfu-Zahl/ml Spülflüssigkeit: (1) ●: $\leq 5 \times 10^6$; (2) ▲: $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$; (3) ■: $> 5 \times 10^7$



Statistische Daten der einzelnen Keimzahlbereiche:

(1) $n = 29$

$r = 0,58$

$s_{y \cdot x} = 0,51$

$y = 4,04 + 0,37x$

(2) $n = 23$

$r = 0,77$

$s_{y \cdot x} = 0,28$

$y = 1,32 + 1,18x$

(3) $n = 39$

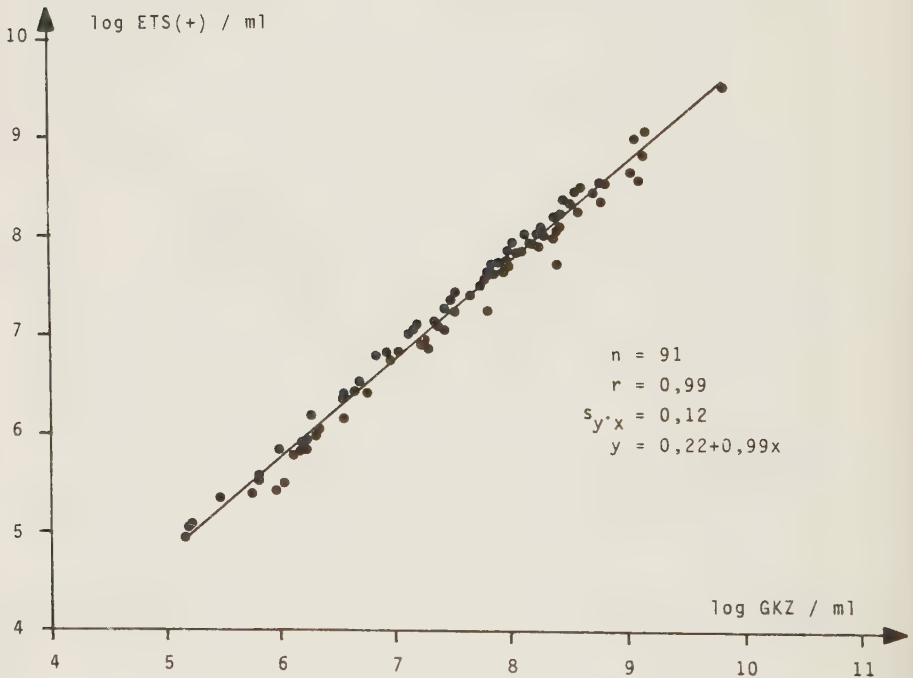
$r = 0,82$

$s_{y \cdot x} = 0,24$

$y = 1,12 + 0,85x$

Abb.21:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und mikroskopisch ermittelter Gesamtkeimzahl (GKZ) bei Abspülproben von Fleischoberflächen pro ml Spülflüssigkeit



IV.3.2.2. Vergleich der Drop plating-Werte zur mikroskopischen Gesamtkeimzahl

Die unter IV.3.2.1. dargelegten Zusammenhänge wurden durch den Vergleich Cfu - mikroskopische Gesamtkeimzahl bestätigt. Für diese, in Abbildung 22 dargestellten Zusammenhänge wurden Korrelationen ermittelt, die mit denen des Vergleiches Cfu - ETS-positive Mikroorganismen identisch waren. Der Korrelationskoeffizient errechnete sich mit $r=0,92$ ($s_{y \cdot x}=0,41$), die Steigung der Regressionsgeraden betrug $b=0,69$.

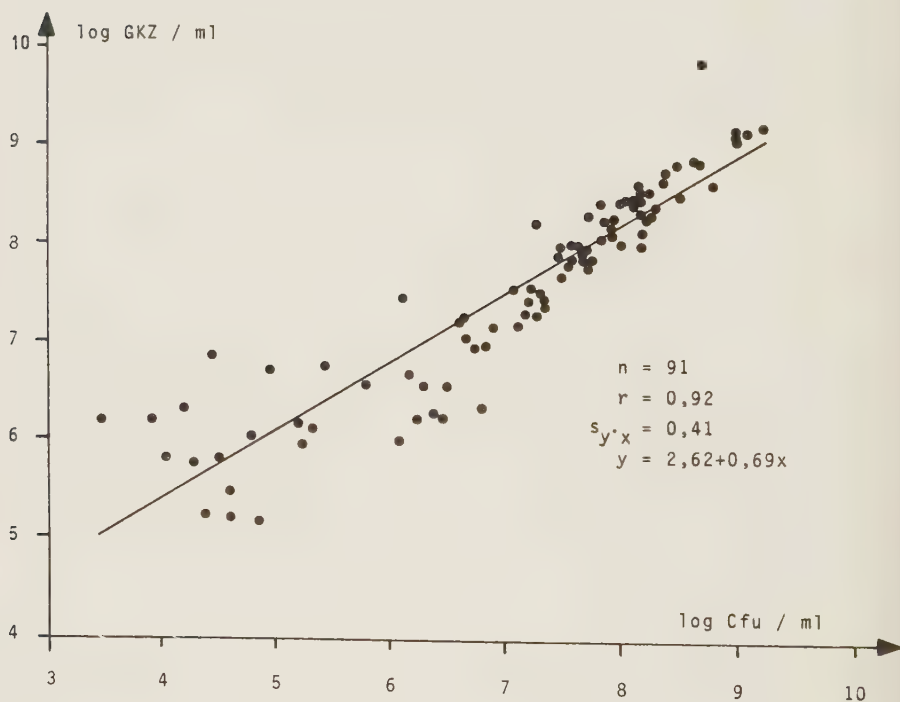
IV.4. Zur Dauer der möglichen Aufbewahrungszeit der Filterpräparate

Ein Teil der angefertigten Filterpräparate der Reinkulturen und der Fleischproben wurden bei $+4^{\circ}\text{C}$ unter Lichtausschluß im Kühlschrank gelagert und in monatlichen Intervallen auf eine eventuelle Abschwächung der Fluoreszenzintensität und der Identifizierbarkeit ETS-positiver Mikroorganismen hin untersucht. Auch bei bis zu einem Jahr alten Präparaten (angefertigt im September 1981) konnte nach der - sicherlich subjektiven - Meinung des Verfassers kein Qualitätsabfall des mikroskopischen Bildes festgestellt werden.

Eine zweite Möglichkeit der Dokumentation des Untersuchungsergebnisses besteht darin, Photographien des mikroskopischen Bildes (Diapositive oder Polaroidaufnahmen) anzufertigen, die dann unbeschränkt lange aufbewahrt werden können. Einschränkend ist dazu zu sagen, daß ausschließlich hochempfindliche ($> \text{DIN } 27-$) Filme verwendet werden müssen, eine Voraussetzung, die z.B. für farbige Polaroid-Aufnahmen zur Zeit nicht erfüllbar ist.

Abb.22:

Beziehung zwischen mikroskopischer Gesamtkeimzahl (GKZ) und kultureller Keimzahl Cfu bei Abspülproben von Fleischoberflächen pro ml Spülflüssigkeit



IV.5. Versuche zur Anwendung der Epifluoreszenzmethode bei anderen
Fleischproben (Hackfleisch, Rohwurst, Fleischkonserven) und
Überprüfung der Auswertetechnik sowie der personenabhängigen
Reproduzierbarkeit

IV.5.1. Statistische Absicherung der Auswertetechnik

Eine Voraussetzung für die mikroskopische Auszählung der Anzahl der Mikroorganismen, die durch den Filtrationsvorgang auf dem Nuclepore^R-Filter konzentriert wurden, ist deren zufällige Verteilung auf der Filtermembran (Poisson-Verteilung, SACHS, 1978). Da der Anteil eines mikroskopischen Bildes bei den durchgeführten Untersuchungen nur den 51.611. Teil der effektiven Filtrationsfläche ausmacht, können bei der Auszählung der Keime erhebliche Über- bzw. Unterschätzungen der Ergebnisse eintreten, sofern eine ungleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Filter vorliegt.

Um diesem Faktor Rechnung zu tragen, wurden Proben unterschiedlichen Keimgehaltes pro ml filtriert und deren Verteilung auf dem Filter ermittelt. Dazu dienten verschiedene Verdünnungsstufen von Fleisch-homogenisaten, deren Keimgehalt durch eine sorgfältige Verdünnung im Verhältnis 1:10 so eingestellt war, daß bei der niedrigeren Verdünnungsstufe im Durchschnitt 67 Mikroorganismen pro mikroskopisches Gesichtsfeld ausgezählt wurden. Die nächsthöhere Verdünnungsstufe ergab im Mittel 9 Keime pro Gesichtsfeld. Nach der mäanderförmigen Auszählung von 200 Gesichtsfeldern auf jedem Filter wurden die erzielten Ergebnisse biometrisch auf ihre Aussagekraft geprüft. Dazu wurden die 200 Einzelauszählungen in 4x50 Auszählungen unterteilt und die Übereinstimmung dieser miteinander kontrolliert.

Es stellte sich heraus, daß die 200 ausgezählten Einstellungen der höheren Verdünnungsstufe (9 Keime pro Gesichtsfeld) besser übereinstimmten als die der niedrigeren Verdünnungsstufe. Bei der letzteren waren häufig Verklumpungen und, dadurch bedingt, Übereinanderlagerungen von Mikroorganismen anzutreffen, was möglicherweise zu einer zu starken Abweichung der Einzelauszählungen untereinander führte. So wurde für die niedrigere Verdünnungsstufe eine repräsentative Aussagemöglichkeit anhand der Auszählung

einzelner Gesichtsfelder abgelehnt, nicht jedoch bei der Probe, die nur den circa 10. Teil der Keime pro ml enthielt. Die Mikroorganismen dieser Probe waren einheitlich und zufällig über das Filter verteilt, Verklumpungen und Übereinanderlagerungen traten nicht auf. Eine Dichte von 9 Keimen pro mikroskopischem Gesichtsfeld entspricht einer Anzahl von 5×10^5 Mikroorganismen pro ml filtrierter Probe unter Berücksichtigung des oben erwähnten Umrechnungsfaktors von 51.611. Die Einzeldaten dieser Untersuchung sind in Tab. 25 aufgelistet.

IV.5.2. Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei verschiedenen Fleischproben (Hackfleisch, Rohwurst, Fleischkonserven)

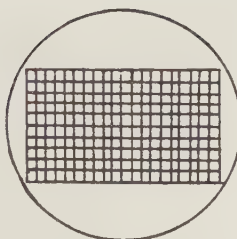
Maßgeblich für die Identifizierung atmungsaktiver und damit lebender Zellen war allein der Nachweis eingelagerter Formazangranula in den Keimen. Die Erfassung dieser Zellen erforderte eine konzentriertere Durchmusterung des mikroskopischen Präparates als z.B. die alleinige Auszählung der Gesamtzahl fluoreszierender Mikroorganismen und erhöht dadurch den Ermüdungsfaktor des Untersuchers um ein Vielfaches.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sollte daher durch die Auswertung unterschiedlicher und gleicher Filterpräparate von mehreren Personen bestätigt werden. Bei der ersten Überprüfung wurden je 10 gleiche mikroskopische Gesichtsfelder von 5 Prüfpersonen ausgezählt. Dabei wurden (1.) die Anzahl ETS-positiver Keime bestimmt und (2.) die Gesamtkeimzahl ausgezählt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 26 aufgelistet.

Bei der zweiten Überprüfung wurden von jedem Untersucher je 10 mikroskopische Gesichtsfelder selber eingestellt und ausgezählt. Es wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zwei identische Filter ausgewertet, ohne daß die Untersucher davon Kenntnis hatten. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 27 und 28 zusammengestellt.

Tab.25

Schema der Lage der Gesichtsfelder auf dem Filter



Auszahlungsbefunde von jeweils 200 Gesichtsfeldern von Filtern verschiedener Keimdichte einer Nativprobe in der Reihenfolge der Befunderhebung

I. Errechnete durchschn. mikrosk.GKZ: 67/Gesichtsfeld

89	77	73	89	119	106	12	80	82	78	55	84	46	67	82	66	101	80	82	21	1-20
83	55	83	75	70	107	53	83	44	43	65	72	83	100	46	57	70	66	71	89	40-21
98	130	96	62	105	96	90	42	69	99	83	76	74	71	68	67	74	64	78	97	41-60
70	95	69	93	67	57	92	73	84	79	47	61	79	71	70	62	61	50	76	53	80-61
82	67	74	78	60	58	63	45	74	68	65	54	66	76	70	56	82	75	60	84	81-100
83	61	60	44	30	52	54	32	43	38	52	56	61	49	43	49	49	45	42	67	120-101
46	59	66	51	44	52	50	60	44	51	39	49	45	66	71	61	60	63	71	69	121-140
58	75	58	78	67	76	70	80	79	81	47	46	53	54	71	94	66	69	70	64	160-141
78	51	68	67	68	54	32	44	56	66	54	52	28	44	43	67	58	69	75	61	161-180
68	61	67	72	63	43	44	75	64	33	36	67	51	70	55	62	65	61	69	81	200-181

GKZ: Gesamtkeimzahl

II. Errechnete durchschn. mikrosk.GKZ: 9/Gesichtsfeld

6	9	6	4	5	7	13	10	9	13	6	7	6	10	10	9	11	5	5	9	1-20
12	5	8	12	7	9	9	8	8	7	4	5	11	13	11	11	10	9	10	8	40-21
5	8	6	9	5	14	14	16	13	10	11	7	6	12	8	9	11	13	8	10	41-60
5	9	8	11	9	7	10	11	9	6	9	12	9	10	6	4	6	9	11	14	80-61
8	11	10	16	8	14	9	6	4	8	14	4	6	5	7	5	7	9	7	11	81-100
13	8	11	7	8	5	9	9	6	5	5	3	12	9	16	12	7	6	8	9	120-101
6	8	11	7	8	5	15	8	12	5	8	4	6	11	13	6	9	9	10	8	121-140
9	9	10	10	5	5	8	12	7	3	10	7	7	7	10	13	11	9	12	12	160-141
13	9	7	9	8	5	13	11	7	6	5	4	5	5	10	9	15	13	10	8	161-180
11	6	12	11	6	6	8	12	6	4	7	6	5	6	12	16	8	10	8	6	200-181

Tab.27

Auszählung von vorgegebenen Filtern durch eigene Gesichtsfeld-
einstellung durch 5 Untersucher (3 geübte, 2 ungeübte^(x)) bei einer
nativen kleinstückigen Fleischkonserve nach sechstägiger, offener
Lagerung: doppelte Auszählung erfolgte an 2 aufeinanderfolgenden
Tagen ohne Information der Untersucher über Wiedervorlage gleicher
Filter

Fleischkonservenfiltrat, 10^{-2} verdünnt, geringe Hintergrundfluoreszenz
Kulturelle Keimzahl: $5,2 \times 10^7$; ATP-bestimmte Keimzahl^{x)}: $8,4 \times 10^7$

1. Tag:

Prüfer											ETS-posit.		mikt.GKZ		t (min)
	ETS-posit.					mikt.GKZ					x/GsF.	x/ml	x/GsF.	x/ml	
1	5	5	6	11	3	31	24	33	40	33	6,5	3,4x7	33,5	1,7x8	6'07''
	6	8	11	4	6	35	42	36	29	32					
2	15	13	9	11	13	42	41	37	29	38	13,6	7 x 7	36,9	1,9x8	3'54''
	13	19	15	11	17	37	35	35	38	37					
3	14	18	15	18	22	28	39	40	37	39	16	8,3x7	33,4	1,7x8	10'05''
	10	14	19	11	19	30	31	32	27	31					
4 [⊗]	7	16	28	19	33	17	35	42	30	45	20,4	1,1x8	34	1,8x8	12'36''
	21	16	19	24	21	34	28	33	40	36					
5 [⊗]	11	27	16	12	11	21	36	22	20	17	12,3	6,3x7	21,6	1,1x8	10'01''
	11	8	11	6	10	19	24	22	17	18					

2. Tag:

Prüfer	ETS-posit.				mikt.GKZ				t (min)						
	x/GsF.		x/ml		x/GsF.		x/ml								
1	10	8	15	9	9	30	24	51	20	23	10,4	5,4x7	29,5	1,5x8	4'59''
	14	6	18	7	8	29	22	47	16	33					
2	14	16	11	18	17	39	37	26	38	42	15,8	8,2x7	35,9	1,9x8	3'54''
	20	15	17	11	19	33	33	35	28	48					
3	11	14	10	17	19	30	27	26	32	35	14,1	7,3x7	29,2	1,5x8	8'53''
	13	14	17	10	16	29	21	36	24	32					
4 [⊗]	8	20	23	13	14	13	31	39	25	20	14,6	7,5x7	27,9	1,4x8	8'22''
	15	11	16	12	14	27	26	28	20	27					
5 [⊗]	14	13	12	11	18	27	25	26	24	34	13,6	7x7	28,4	1,5x8	8'26''
	15	14	16	11	12	30	30	33	25	30					

x): Keimzahlbestimmung mit der ATP-Messung nach BOLTE (1982),
Mitarbeiter des Institutes.

GsF.: Gesichtsfeld

Tab.28 Auszählung von vorgegebenen Filtern durch eigene Gesichtsfeld-
einstellung durch 5 Untersucher (3 geübte, 2 ungeübte^(x)) bei einer
nativen kleinstückigen Fleischkonserve nach siebentägiger, offener
Lagerung: doppelte Auszählung erfolgte an 2 aufeinanderfolgenden
Tagen ohne Information der Untersucher über Wiedervorlage gleicher
Filter

Fleischkonservenfiltrat, 10^{-2} verdünnt, geringe Hintergrundfluoreszenz
Kulturelle Keimzahl: $4,7 \times 10^7$; ATP-bestimmte Keimzahl^{x)}: $1,1 \times 10^8$

1. Tag:

Prüfer	ETS-posit.										mikr.GKZ				t (min)
	x/GsF.					x/ml					x/GsF.		x/ml		
1	5	14	11	7	9	41	61	33	38	37	8	4,1x7	39,8	2,1x8	7'45''
	4	4	10	8	8	32	38	36	49	33					
2	25	12	13	12	11	59	46	48	46	38	15,1	7,8x7	49,3	2,5x8	4'53''
	14	19	16	11	18	46	56	52	42	60					
3	11	15	14	15	13	36	42	47	40	45	14.1	7.3x7	43.5	2.2x8	7'08''
	16	13	16	11	18	46	45	45	41	48					
4 [⊗]	21	26	26	21	16	32	42	44	36	34	19,3	9,9x7	36,8	1,9x8	13'11''
	17	23	11	19	13	34	37	42	36	31					
5 [⊗]	10	12	10	15	13	40	33	41	36	50	11,4	5,9x7	37,2	1,9x8	11'24''
	8	12	11	11	12	33	39	29	39	32					

2. Tag:

Prüfer	ETS-posit.				mikr.GKZ				t (min)	
	x/GsF. x/ml				x/GsF. x/ml					
1	13	14	9	11	8	46	41	26	43	36
	10	10	12	18	12	30	30	44	57	47
2	21	16	12	20	16	33	48	35	50	49
	26	13	14	7	11	70	45	47	43	47
3	18	12	9	10	18	41	30	34	39	35
	12	14	13	10	8	36	37	29	40	32
4 ^(x)	15	25	27	19	22	26	47	39	31	34
	23	28	21	15	13	39	47	34	37	31
5 ^(x)	22	22	17	23	15	34	33	33	30	35
	18	17	23	18	21	39	32	34	22	24

x): Keimzahlbestimmung mit der ATP-Messung nach BOLTE (1982),
Mitarbeiter des Institutes

GsF.: Gesichtsfeld

Wie aus den Tabellen für die Auswertung der jeweils 10 gleichen Gesichtsfelder durch 5 verschiedene Untersucher ersichtlich ist, sind die bei der Auszählung der Anzahl ETS-positiver Mikroorganismen auftretenden Differenzen für die Beurteilung des untersuchten Substrates vernachlässigbar (Streubereich von $5,7 \times 10^6$ bis $7,9 \times 10^6$ bei Hackfleisch und $1,2 \times 10^7$ bis $1,5 \times 10^7$ bei der Rohwurst, sowie $4,1 \times 10^7$ bis $5,7 \times 10^7$ bei der Fleischkonserve). Ebenso enge Zusammenhänge wiesen die mikroskopisch ermittelten Gesamtkeimzahlen auf, mit Werten zwischen $1,5 \times 10^7$ und $2,0 \times 10^7$ für das Hackfleisch, $2,7 \times 10^7$ und $3,3 \times 10^7$ für die Rohwurst sowie $9,2 \times 10^7$ und $1,4 \times 10^8$ für die Fleischkonserve.

Die Auswertung der Filter von verschiedenen Untersuchern (3 geübte, d.h. in der mikroskopischen Auszähltechnik erfahrene Mitarbeiter, 2 weniger geübte) zeigte die Genauigkeit und Einfachheit des Verfahrens auf, wenngleich die ungeübten Beobachter teilweise mehr als die doppelte Zeitspanne für die Auszählung der 10 Gesichtsfelder benötigten. Die Anzahl zu zählender Keime auf dem Filter spielt neben der statistischen Bedeutung, die ihr zukommt, auch für die benötigte Untersuchungszeit eine entscheidende Rolle. Dies wurde bei der Untersuchung des Fleischkonservenfiltrates mit einer mittleren Gesamtkeimzahl von 22 pro mikroskopischem Gesichtsfeld verdeutlicht, die durchschnittliche Untersuchungsdauer war hierbei wesentlich geringer als bei den beiden anderen Probenarten mit 35 bzw. 58 Keimen pro Gesichtsfeld. Der insgesamt enge Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der einzelnen Untersucher wurde durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse bestätigt, die für die erzielten Werte bei der Auszählung von 10 vorgegebenen Gesichtsfeldern durch jeweils 5 Personen erstellt wurde.

Bei den vergleichenden Untersuchungen identischer Filterpräparate, bei denen jeder Beobachter 10 selbstgewählte mikroskopische Gesichtsfelder auswertete, unterlag die Anzahl ETS-positiver Keime zwar stärkeren Schwankungen von Prüfer zu Prüfer ($3,4 \times 10^7$ bis $1,1 \times 10^8$ respektive $4,1 \times 10^7$ bis $1,1 \times 10^8$) als bei dem vorhergehenden Versuch, die Einzelbestimmungen der Gesamtkeimzahl pro ml Probe lagen hingegen wiederum sehr eng zusammen ($1,1 \times 10^8$ bis $1,9 \times 10^8$ bzw. $1,6 \times 10^8$ bis $2,5 \times 10^8$). Die bessere Übereinstimmung bei der Auszählung der Gesamtkeimzahl erscheint einleuchtend,

da hierbei lediglich die Zahl der fluoreszierenden Zellen bestimmt wurde und eine Unterscheidung in ETS-positiv und ETS-negativ entfiel. Bemerkenswert sind die Zeiten, die für die Auszählung der 10 mikroskopischen Gesichtsfelder benötigt wurden. Nur in 2 Fällen wurde dafür mehr als 10 min gebraucht. Eine Erklärung hierfür mag in der Untersuchungstechnik begründet liegen. Die Beobachter stellten bei dieser Versuchsreihe die 10 mikroskopischen Gesichtsfelder selber ohne Unterbrechnung ein und mußten sich dadurch nicht erst wieder an das mikroskopische Bild gewöhnen, wie es bei der vorherigen Untersuchung der Fall war, bei der jeder die gleichen Gesichtsfelder auszählen sollte und dadurch nach jeder Einzelzählung eine Unterbrechung der Auswertung erfolgte.

Die auswertenden Personen waren anhand zweier Filterpräparate auf die Unterschiede zwischen ETS-positiven und ETS-negativen Keimen hingewiesen worden. Es bestanden keine generellen Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von Keimen gegenüber auf dem Filter vorhandenen Begleitpartikeln aus dem Probesubstrat. Die Bakterienzellen waren aufgrund ihrer Form und Größe gut identifizierbar.

V. D i s k u s s i o n d e r E r g e b n i s s e

V.1. Grundsätzlich zu beachtende methodische Voraussetzungen beim quantitativen Nachweis von lebenden und toten Zellen mit der Epifluoreszenztechnik

Bei der Untersuchung der Filterpräparate mit der Epifluoreszenztechnik waren verschiedene Voraussetzungen zu beachten, die die Anwendung der beschriebenen Methode wesentlich erleichtern konnten:

Die Benutzung des Epifluoreszenzmikroskopes erfolgte zur Steigerung der Adaption des Auges und der Konzentration des Untersuchers in einem abgedunkelten Raum, da die in den Farben grün, gelb, orange bis orangefarben fluoreszierenden Keime nur einen Bruchteil des hauptsächlich aus dem dunkelgrünen Hintergrund des Polycarbonatfilters bestehenden mikroskopischen Bildes ausmachten. Zur Erzielung maximaler Helligkeitskontraste im mikroskopischen Bild mußte außerdem die verwendete Epifluoreszenzanregungsstrahlung dem für die Anfärbung der Mikroorganismen benutzten Fluorochrom entsprechen. Zu diesem Zweck bedient man sich spezieller Filter, die in den Strahlengang des anregenden Fluoreszenzlichtes eingeschaltet werden und nur den jeweils gewünschten Teil der Strahlung zum Präparat gelangen lassen. Durch eine möglichst erschütterungsfreie Aufstellung des Mikroskopes, z.B. auf der Schwingplatte eines Wägetisches, ließen sich sonst auftretende visuelle Irritationen des Untersuchers vermeiden.

Für die Untersuchung der Proben mit hohem Eiweißgehalt und anderen Fremdpartikeln, die von dem Fluoreszenzfarbstoff mitangefärbt werden, bedurfte es einer ausreichenden Vorreinigung, um eine Fremdfluoreszenz möglichst auszuschalten. Hierfür erwies sich die Filtration der flüssigen Proben über Glasfaservorfilter als geeignete Methode. Durch die Benetzung der Glasfaservorfilter mit einem oberflächenaktiven Stoff wurde ein frühzeitiges Verstopfen verhindert und gleichzeitig eine ausreichende Durchflußrate für die in den Probesubstraten enthaltenen Keime erreicht. Durch einen experimentellen und biometrisch ausgewerteten Vergleich der aus unfiltrierten und filtrierten Proben erzielbaren Koloniezahlen konnten Bedenken hinsichtlich

einer verfälschenden Reduzierung der Zellzahl durch diese Vorfiltration ausgeräumt werden. Dabei war die ermittelte Streuung der Werte bei den Abspülproben geringer als bei den Abtrageproben, was sich aus dem unterschiedlichen Verunreinigungsgrad der Substrate erklären läßt. Mit den in den Abtragehomogenisaten vermehrt vorhandenen Beimengungen wurden bei deren Abscheidung durch das Vorfilter an ihnen anhaftende Keime in stärkerem Maße zurückgehalten als bei den Anspülproben. Die z.T. erhöhte Keimzahl filtrierter Proben ist vermutlich auf eine starke Zellvermehrung während der Dauer der Verarbeitung zurückzuführen. Auch bei der Anwendung der Nuclepore^R-Polycarbonatfilter, auf denen die Mikroorganismen aus der gereinigten Probe konzentriert und angefärbt wurden, galt es, einige wichtige Voraussetzungen zu beachten. Die Filter wurden vor ihrem Gebrauch für mindestens 18 Stunden in eine 0,005% Lösung des Farbstoffes Sudanschwartz-B in 50% Äthanol eingelegt. Durch die eintretende Dunkelfärbung der Filter wurde deren Eigenfluoreszenz praktisch ausgelöscht und ein verstärkter Kontrast der auf der Filteroberfläche liegenden fluoreszierenden Keime zum Hintergrund im mikroskopischen Bild erzielt (ZIMMERMANN et al., 1978). Die überaus ebene Oberfläche der Nuclepore^R-Filter erleichterte das Auffinden der Keime sehr.

Wichtig war weiterhin der Einsatz eines geeigneten fluoreszenzfreien Immersionsöles. Für die Einbettung der Filter auf Objektträgern wurde "Cargille LF"-Immersionsöl benutzt, da nach den Angaben von ZIMMERMANN et al. (1978) und BECKER-BIRK (1979) andere Immersionsöle in der Lage sind, die in den atmenden Bakterien gebildeten Formazangranula aus diesen herauszulösen. Durch das Immersionsöl wurden die Filter transparent und somit für den nicht reflektierten Teil der Fluoreszenzanregungsstrahlung durchlässig gemacht, was zu einem erhöhten Kontrast Mikroorganismus/Filterhintergrund führte.

Eine weitere Voraussetzung war, daß sich beim Filtrationsvorgang die Keime zufällig auf dem Filter verteilt hatten. Dieses wurde vor der Auszählung einzelner Gesichtsfelder durch eine grobe Durchmusterung des Filters überprüft. Dabei war nach den biometrischen Erhebungen eine Keimdichte auf dem Filter von durchschnittlich 10 Keimen pro mikroskopischem Gesichtsfeld anzustreben, um eine homogene Verteilung vorauszusetzen. Bei

einer Überschreitung dieses Grenzwertes konnte es zur Aggregation von Bakterienzellen auf dem Filter kommen, die eine Einzelzählung von Keimen oder ihre Charakterisierung anhand eingelagerter Formazangranula unmöglich machte. Außerdem kam es zur Bildung regelrechter Bakteriennester auf einzelnen Stellen des Filters, die durch Kohäsion der Mikroorganismen untereinander hervorgerufen werden, wenn entsprechende Keimdichten in der Probenflüssigkeit vorhanden sind. Dieser Tendenz mußte durch eine Verdünnung des Substrates entgegen gewirkt werden.

Die Möglichkeit, sich bei der Auszählung auf 10 Gesichtsfelder von 51.611 möglichen eines Filters zu beschränken, wurde ebenfalls biometrisch belegt. Auch hierfür waren eine zufällige Keimverteilung und eine nicht zu hohe Keimdichte auf dem Filter Voraussetzungen. Da der Keimgehalt nativer Proben eine unbekannte Größe ist und die mit der jeweiligen Probe auf dem Filter erzielte Keimzahl nicht sicher vorhersehbar sein kann, ergibt sich hin und wieder die Notwendigkeit einer zweiten Filterbearbeitung, um den Auswertebedingungen gerecht zu werden.

Das Auffinden atmungsaktiver Keime auf dem Filter wurde durch die Möglichkeit erleichtert, zu der von oben auf das Präparat fallenden anregenden Fluoreszenzstrahlung normales Durchlicht geringer Intensität hinzuzuschalten. Hierbei wurde die von den Bakterien emittierte Fluoreszenzstrahlung soweit zurückgedrängt, daß deren Konturen gerade noch erkennbar waren und die dunklen Formazangranula in den Keimen deutlicher hervortraten. Dieses deckt sich mit den Angaben von ZIMMERMANN et al. (1978) und BECKER-BIRK (1979), die sich derselben Methodik bedienten. Dadurch wurde auch die Identifizierung eingelagerter Formazangranula in relativ kleinen Keimen wie Kokken oder kokkoiden Stäbchen ermöglicht, die sich immer dann recht schwierig gestaltete, wenn die Granula einen Großteil der Zellen ausfüllten. Ein wiederholtes Nachfokussieren der Objektebene war unerlässlich, um alle in einem mikroskopischen Gesichtsfeld vorhandenen Keime nach ihrer Atmungsaktivität beurteilen zu können.

Eine Differenzierung der Keime nach lebenden und toten anhand der von ihnen emittierten Farbe des Fluoreszenzlichtes ließ sich in den vorliegenden Untersuchungen nicht vornehmen. Diese Aussage steht zwar im Gegensatz zu den Beobachtungen von STRUGGER (1942) und HOBIE et al. (1976), entspricht jedoch den Angaben der Mehrzahl der Autoren, die sich mit dieser Problematik auseinandergesetzt haben (KORGAONKAR & RANADE, 1965; BUCHERER, 1965; FRANCISCO et al., 1973; ZIMMERMANN, 1974; JONES & SIMON, 1975; ZIMMERMANN et al., 1978; BECKER-BIRK, 1978, 1979). Durch die Möglichkeit, lebende Mikroorganismen anhand eingelagerter Formazangranula zu identifizieren, konnten die in der Literatur beschriebenen Unsicherheiten umgangen werden.

Die Farbe der erzeugten Fluoreszenzstrahlung der Mikroorganismen lag hauptsächlich im gelb-orangen Bereich des sichtbaren Lichtes. Grün fluoreszierende Keime waren in wechselnder, wenn auch anteilmäßig niedriger Anzahl in nahezu jeder untersuchten Probe vorhanden. Es wurden auch Keime dieser Farbe als ETS-positiv identifiziert. Ihre Entdeckung auf dem Nucleopore^R-Filter erforderte besondere Aufmerksamkeit, da sich dieser als homogen dunkelgrüner Hintergrund im mikroskopischen Bild darstellte.

Je größer der Kontrast der angefärbten Zellen zu dem Filterhintergrund war, desto einfacher gestaltete sich deren Entdeckung und Auszählung im mikroskopischen Bild. Dieses kam vor allem bei der Auszählung der mikroskopischen Gesamtkeimzahl zum Tragen, bei der lediglich die Gesamtzahl fluoreszierender Zellen, ohne Unterscheidung in ETS-positive und ETS-negative, ermittelt wurde. Auch bei einer möglichen automatischen Auszählung der Keime auf dem Filterpräparat durch computergesteuerte TV-Kameras auf dem Mikroskop ist dieser Helligkeitsunterschied von Bedeutung, da die Anzahl zu zählender Partikel letztlich durch Hell/Dunkel-Unterschiede im mikroskopischen Bild ermittelt wird. Grün oder auch rot fluoreszierende Keime werden von einer solchen Anlage gegen einen dunklen Filterhintergrund nicht wahrgenommen. Auf ihre Erfassung muß verzichtet werden. Durch ihre geringe Anzahl in allen untersuchten Proben spielte dieser Anteil jedoch keine entscheidende Rolle für eine Aussage über die Gesamtkeimzahl. Auch für das menschliche Auge erscheint die Identifizierung derart fluoreszierender Zellen ungleich schwerer als die Entdeckung von Zellen, die Fluoreszenzlicht im gelben bis gelb-

orangen Bereich des sichtbaren Lichtes emittieren.

Die Fluoreszenz trat sowohl bei den untersuchten Reinkulturen als auch bei den Proben des untersuchten Biotops Fleischoberfläche überwiegend, d.h., auch die Keimzahl bestimmend, in dem gut abgrenzbaren Farbbereich auf, so daß selbst die versuchsweise automatisch ausgezählten Filterproben auffallend gute Korrelationen zu den kulturellen und den mikroskopisch manuell bestimmten Werten aufwiesen.

Die manuelle mikroskopische Untersuchungstechnik bewirkte einen Ermüdungseffekt beim Beobachter, der von der Qualität des mikroskopischen Bildes bestimmt wurde. Er verstärkte sich bei einer Abgrenzung lebender von abgestorbenen Keimen anhand eingelagerter Formazangranula noch einmal maßgeblich wie zuvor bei der Auszählung farblich verschiedenen fluoreszierender Zellen. Bei der Ermittlung von lebensfähigen Keimen mußte deshalb nach einer Auswertezeit von circa 1 Stunde eine 15 minütige Pause eingelegt werden, um Fehler bei der Auszählung der Filterpräparate durch nachlassende Konzentrationsfähigkeit zu vermeiden, d.h., es konnten jeweils etwa 6 Filter hintereinander ausgewertet werden. Bei einer Auszählung lediglich der mikroskopischen Gesamtkeimzahl ließen sich 12 Filter im gleichen Zeitraum verkraften.

V.2. Aussagekraft des Epifluoreszenzverfahrens im Vergleich zu kulturellen Verfahren bei Reinkulturen

Mit der Überprüfung von Reinkulturen der Mikroorganismen, die zu den Hauptrepräsentanten der Fleischflora gehören, konnte die prinzipielle Anwendbarkeit des mikroskopischen Auflichtfluoreszenzverfahrens in Verbindung mit dem Nachweis eines aktiven Elektronentransportsystems als Parameter für die Vermehrungsfähigkeit der Keime nachgewiesen werden. Dabei war grundsätzlich kein Unterschied zwischen den untersuchten Keimspezies auszumachen, gleich ob es sich um Stäbchen oder Kokken, psychrophile oder mesophile Keime handelte oder ob sich die Mikroorganismen in sonstigen biochemischen Parametern voneinander unterschieden. Das Problem einer eventuellen Hintergrundfluoreszenz spielte bei diesen Proben keine Rolle, da die

Keimsuspensionen praktisch frei waren von Verunreinigungen. Alle Präparate waren eindeutig auswertbar.

Die Fragestellung, ob kulturell feststellbare Keimzahlen mit der Anzahl ETS-positiver Zellen beim Epifluoreszenznachweis übereinstimmen, konnte wie folgt beantwortet werden: bei 69,4% (161) der 232 Einzeluntersuchungen lag die Anzahl ETS-positiver Mikroorganismen über der parallel ermittelten Koloniezahl, bei 25,4% (59) war sie geringer, bei 5,2% (12) identisch.

Die bei der Mehrzahl der Proben reduzierte Koloniezahl mag durch verschiedene Ursachen bedingt gewesen sein: die mikroskopisch nachweisbare Atmungsaktivität könnte beim Altern einer Kultur länger nachweisbar sein als die Fähigkeit der Zellen, zu Kolonien anzuwachsen. Dieses deutete sich an bei älteren Kulturen (48 bzw. 72 Stunden) der geprüften Mikroorganismen *E. coli*, *Enterob. aerogenes*, *St. aureus*, *L. plantarum* und *Mc. luteus*. Aufgrund des kulturellen Nachweises war bereits die Absterbephase dieser Kulturen erreicht, bei *Enterob. aerogenes* in beiden Versuchsansätzen, bei den anderen Stämmen nur in einem der beiden Versuche, während die Anzahl atmungsaktiver Zellen anhaltend hoch war bzw. sogar noch anstieg. So lagen die Einzelwerte alter Kulturen (48 und 72 Stunden-Werte) bei allen Stämmen der zwei Versuchsansätze zu 91,7% über den entsprechenden Koloniezahlen. Sie bestätigten die Tendenz, daß bei älteren Kulturen mit der mikroskopischen Keimzählmethode durchweg höhere Ergebnisse erzielt werden als mit kulturellen Nachweisen.

Die zweite Möglichkeit für eine reduzierte Koloniezahl mag in der Aggregation von Zellen beim kulturellen Nachweis bestehen. Auf dem Filter hingegen ist, sofern eine bestimmte Dichte durch Vorverdünnung der Probe eingestellt ist, die Einzeldarstellung von Bakterienzellen möglich. Die Aggregation ist insbesondere bei kettenbildenden Mikroorganismen von Bedeutung, die mikroskopisch einzeln erfaßt und aufgelistet werden können, kulturell jedoch oft nur zu einer Kolonie auswachsen.

Die Epifluoreszenztechnik führte erst ab einer Zellzahl von 5×10^5 pro ml Ausgangskeimsuspension zu aussagekräftigen Ergebnissen. Diese untere Nachweisgrenze ist methodisch bedingt, da nach den Erfahrungs-

werten und nach biometrischer Absicherung die Anzahl der pro mikroskopischem Gesichtsfeld zu zählenden Keime bei durchschnittlich 10 liegen sollte. Durch den Multiplikationsfaktor 51.611, mit dem auf die in der filtrierten Probenmenge von 1 ml enthaltene Keimzahl hochzurechnen war, ergab sich somit die erwähnte untere Nachweisgrenze. Eine Herabsetzung dieser wäre, vor allem im Hinblick auf Vergleichsmöglichkeiten mit kulturellen Verfahren auch in niedrigeren Keimzahlbereichen, durchaus wünschenswert. Sie wäre jedoch nur durch eine Erhöhung der filtrierten Probenmenge (z.B. 10 ml anstatt 1 ml) realisierbar, eine Voraussetzung, die für Suspensionen von Reinkulturen erfüllbar wäre, nicht jedoch für Proben nativer Substrate, die selbst nach erfolgter Vorreinigung noch ein gewisses Maß an Verunreinigungen mit nicht-mikrobiellen Beimengungen aufweisen. Die Erhöhung des filtrierten Volumens brächte dann auch eine Erhöhung der Verunreinigungen auf dem Filter mit sich, was wiederum zu einer erhöhten Hintergrundfluoreszenz führte, die die Auswertung der Filter unmöglich machen könnte.

V.3. Anwendbarkeit des Epifluoreszenzverfahrens bei nativen Proben (Abspül- und Abtrageproben von Fleischoberflächen)

Ein Problem bei der Untersuchung der Abtrage- und Abspülproben von Fleischoberflächen stellte die Aufbereitung der Probensubstrate dar. Um im mikroskopischen Bild die auszuzählenden Mikroorganismen gut von dem sie umgebenden Medium abgrenzen zu können, mußten die flüssigen Probensubstrate (die flüssige Phase des Homogenisates bzw. die Abspülprobe) in ausreichendem Maße von unerwünschten Beimengungen wie Muskelzellen, Detritus und sonstigem Fleischiweiß, befreit sein, welches durch eine Vorfiltration über Glasfaservorfilter erreicht werden sollte.

Diese Forderung war für die Abspülproben leichter erfüllbar, da sie im Vergleich zu den Abtrageproben geringere Mengen an Fremdpartikeln enthielten. Dadurch verminderte sich auch die Wahrscheinlichkeit, daß Mikroorganismen an den Partikeln anhaften konnten und mit diesen bei der Vorfiltration im Glasfaserfilter hängen blieben. Diese Vermutung ließ sich durch den kulturellen Vergleich von Proben vor und nach dem Filtrieren belegen.

Bei Abtrageproben wiesen die durch die Vorfiltration auftretenden Keimverluste eine größere Streuung der Einzelwerte auf als bei Abspülproben. Durch die Vorfiltration der Abtrageproben konnte zwar eine Abtrennung des größten Teiles der Verunreinigungen erreicht werden, jedoch war auch nach dieser Vorbehandlung die Belastung des Filtrates noch so stark, daß erst durch eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 (erste Stufe der Verdünnungsreihe) eine Auswertung im Mikroskop möglich wurde. Lag der Keimgehalt der Abtrageprobe nun in einem Bereich von $\geq 1 \times 10^7$ /ml Homogenisat, so war eine Auswertung mittels der Epifluoreszenzmikroskopie möglich, auch unter Berücksichtigung eventueller Verluste bei der Vorfiltration. Lag der Keimgehalt jedoch unter dieser Grenze, so konnte keine zuverlässige Aussage getroffen werden, weil dann die im mikroskopischen Bild nachweisbare Anzahl an Keimen zu gering war.

Dadurch ergab sich ein weiterer Vorteil für die Abspülproben, die direkt nach der Vorfiltration in derart gereinigter Form vorlagen, daß sie mikroskopisch begutachtet werden konnten. Sie zeigten zudem eine geringere Streuung der Einzelwerte als entsprechend aufbereitete Abtrageproben. Dem Vorteil einer 10fach erhöhten Empfindlichkeit des Verfahrens für Abspülproben stand der Nachteil entgegen, daß mit der Abspültechnik nur etwa 25% der tatsächlich auf der Fleischoberfläche vorhandenen Keime abgeschwemmt werden (REUTER et al., 1979).

Die Anwendung des Epifluoreszenzverfahrens bei der direkten Fluorochromierung der Keime bei nativen Proben von Fleischoberflächen wird sich im wesentlichen nur auf quantitative Aussagen beschränken müssen. Eine mikroskopische Differenzierung der Mikroorganismen ist lediglich aufgrund ihrer Morphologie möglich, z.B. ob es sich um Kokken oder Stäbchen handelt, wobei die Verwechselungsmöglichkeit zwischen kleinen, kokkoiden Stäbchen und echten Kokkenarten groß ist, ausgenommen, letztere liegen in für die einzelnen Spezies charakteristischen Aggregationen (z.B. Ketten bei Streptokokken) auf dem Filterpräparat vor.

V.4. Aussagekraft der Zahl atmungsaktiver Zellen

Durch den Nachweis eines aktiven respiratorischen Systems in einzelnen Mikroorganismen war es möglich, einen mikroskopisch feststellbaren Parameter zu ermitteln, der mit der Fähigkeit des kulturellen Wachstums der Keime verglichen werden konnte. Die bei den einzelnen Proben parallel durchgeführten Untersuchungen zeigten Zusammenhänge auf, die den Gebrauch der Begriffe "kulturbildend" und "atmungsaktiv" als Synonyma gerechtfertigt erscheinen läßt.

Diese Aussage ist jedoch nur innerhalb der aufgezeigten Grenzen des Epifluoreszenzverfahrens zutreffend. Insbesondere durch die Unterteilung der Proben in drei Gruppen nach steigender Anzahl Cfu pro ml Probe konnte verdeutlicht werden, daß erst ab einer Keimbelastung von $\geq 5 \times 10^6$ Cfu/ml ein aussagekräftiger Zusammenhang zwischen der kulturell und der mikroskopisch ermittelten Keimzahl besteht, der umso enger wurde, je höher die Kontamination war. Unterhalb der genannten Keimzahl waren die Streuungen der verglichenen Einzelwerte zu stark, um reproduzierbare Ergebnisse zu liefern.

Die Bedeutung des Atmungsnachweises in den Zellen ist vor allem darin zu sehen, daß eine Aussage über die Belastung eines Substrates mit vermehrungsfähigen Mikroorganismen nicht mehr an zeitraubende kulturelle Keimnachweismethoden gebunden ist. Ein anderer Vorteil ergibt sich daraus, daß mit dem Nachweis eingelagerter Formazangranula als Kriterium der Atmungsaktivität in den Keimen ein objektivierbarer Vergleich zu kulturellen Keimzahlmethoden ermöglicht wurde. Dadurch unterliegt das Epifluoreszenzverfahren nicht mehr den Unsicherheiten, die durch unterschiedliche Theorien über die Lebensfähigkeit der Zellen aufgrund der Farbe des von ihnen emittierten Fluoreszenzlichtes nach Anfärbung mit Acridinorange in der Literatur beschrieben worden sind (STRUGGER, 1942; BUCHERER, 1965; HOBBIIE et al., 1976).

V.5. Aussagekraft der mikroskopischen Gesamtkeimzahl im Vergleich zur Zahl der atmungsaktiven Zellen

Zwischen der Anzahl ETS-positiver Mikroorganismen und der mikroskopisch ermittelten Gesamtkeimzahl aus ETS-positiven und -negativen ließ sich für alle untersuchten Probenarten ein insgesamt enger Zusammenhang nachweisen. Die Streuungen bei den Versuchen an Reinkulturen, die bis zu einer Zellzahl von etwa 5×10^6 /ml auftraten, erklären sich aus dem Versuchsansatz. Die zu Beginn jeder Untersuchungsperiode in frische Nährmedien übertragenen Reinkultureninokulate enthielten reichlich Zellen, die nicht mehr atmungsaktiv waren. So lag der Anteil ETS-negativer Zellen zu Beginn der Untersuchungen zum Teil bis zu einer Zehnerpotenz über dem Anteil ETS-positiver. Dadurch traten in dieser Wachstumsphase (lag-Phase) der Kulturen größere Streuungen auf. In der logarithmischen Vermehrungsphase der Kulturen dagegen korrelierten die beiden Parameter besser. Durch den nunmehr dominierenden Anteil ETS-positiver Keime wurde der Anteil ETS-negativer in der Probe derart zurückgedrängt, daß sie nur einen Bruchteil der Gesamtkeimzahl ausmachten. In der stationären Phase der Kulturen war der Nachweis atmungsaktiver Mikroorganismen noch in hohen Anteilen möglich. Die Anzahl ETS-negativer Keime blieb in dieser Wachstumsphase in etwa gleicher Höhe.

Bei Abtrage- und Abspülproben zeigte sich zwischen der Anzahl ETS-positiver Zellen und der mikroskopischen Gesamtkeimzahl eine gleichbleibend enge Korrelation in allen Keimzahlbereichen. Daraus läßt sich erkennen, daß die Zahl atmungsaktiver Zellen bei diesen nativen Proben die Höhe der Gesamtkeimzahl entscheidend prägte. Die Zahl ETS-negativer Zellen spielte eine vernachlässigbare Rolle. Eine ähnliche Beziehung ergab sich auch zwischen der kulturell ermittelten Koloniezahl und der Gesamtkeimzahl.

Diese Erkenntnisse weisen auf die Möglichkeit hin, zur Beurteilung des Oberflächenkeimgehaltes von Fleisch die mikroskopische Gesamtkeimzahl heranzuziehen. Dadurch ergeben sich Vorteile, die zu einer wesentlichen Reduzierung der zeitlichen und arbeitstechnischen Anforderungen des Epifluoreszenzverfahrens führen. Einerseits entfielen die 20minütige Inkubationszeit der Proben mit dem Tetrazoliumsalz INT, da der Atmungs- und

weis in den Zellen nicht mehr notwendig ist. Der arbeitstechnische Vorteil liegt in der vereinfachten Auszählung der Mikroorganismen im mikroskopischen Bild, da lediglich die Gesamtkeimzahl fluoreszierender Keime zu bestimmen wäre ohne die mühselige Unterscheidung in ETS-positive und ETS-negative Zellen.

Diese Aussage entspricht den Ergebnissen von PETTIPHER et al. (1980), PETTIPHER & RODRIGUES (1981,1982), die bei ihren Untersuchungen von Milch, Molkereiprodukten, Fleisch, Fisch und anderen Lebensmitteln ebenfalls gute Zusammenhänge zwischen der Gesamtzahl fluoreszierender Keime und der kulturell erzielten Keimzahl darstellen konnten.

Durch die Aussagekraft der mikroskopischen Gesamtkeimzahl ergibt sich der besondere Vorteil einer automatischen Auswertung der Filterpräparate. Abgesehen vom hohen Investitionsaufwand einer solchen Apparatur, scheint ein solches Verfahren für die routinemäßige Untersuchung einer großen Probenzahl durchaus sinnvoll zu sein.

V.6. Nachteile der manuellen Auswertung und Möglichkeit des Einsatzes automatischer Bildauswertersysteme

Die besondere Problematik bei der fluoreszenzmikroskopischen Auszählung lag in der Erfassung der ETS-positiven Zellen. Es bedurfte bei nativen Proben mit noch vorhandenen organischen Beimengungen einer anregenden Fluoreszenzstrahlung von zusätzlich etwa 15 sec zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz, um sie als atmende oder nicht atmende charakterisieren zu können. Zusätzlich mußte die Auswertung der Filter in einem verdunkelten Raum erfolgen, um die Adaptation des Auges an das mikroskopische Bild zu erleichtern. Der bei der Untersuchung mikroskopischer Präparate einsetzende Ermüdungseffekt des Untersuchers verstärkte sich bei noch verbliebender Hintergrundfluoreszenz, so daß eine Erholungspause von 15 min nach etwa einer Stunde Untersuchungszeit nötig war. Wurde nun bei der Auswertung der Filter eine Unterscheidung in ETS-positive und ETS-negative Zellen getroffen, so betrug die durchschnittliche Untersuchungszeit 10 min pro

Präparat, d.h., nach jedem sechsten Filter mußte der Untersuchungsgang unterbrochen werden. Bei alleiniger Auszählung der Gesamtzahl fluoreszierender Zellen ließ sich die Anzahl auszuwertender Präparate im gleichen Untersuchungszeitraum verdoppeln.

Der Ermüdungseffekt des Untersuchers kann durch den Einsatz von automatischen Bildauswertern umgangen werden. Es ist möglich, die auf dem dunklen Filterhintergrund gut wahrnehmbaren Mikroorganismen automatisch auszählen zu lassen, doch kann hierbei keine Unterscheidung zwischen ETS-positiven und ETS-negativen Keimen getroffen werden. Diese Einschränkung würde bei der Beurteilung der Abspül- und Abtrageproben von Fleischoberflächen jedoch nicht ins Gewicht fallen, da eine enge Korrelation der Zahl ETS-positiver Zellen zu der Gesamtzahl fluoreszierender Keime nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich ergeben sich aber folgende Probleme und Erfordernisse: (1) alle Verunreinigungen auf dem Filter, die in etwa der Größe von Keimen als auch ihrer Helligkeit entsprechen, werden von dem Apparat als zu zählende Objekte identifiziert und beeinflussen damit das Untersuchungsergebnis. Eine Unterscheidung könnte dadurch getroffen werden, daß eine Person die auf einen Bildschirm projizierten mikroskopischen Bilder beobachtet und zusätzlich bewertet, ob die von dem Apparat gezählten Partikel Bakterienzellen oder Verunreinigungen darstellen. Sollte dieses auch auf dem Weg über den Bildschirm nicht möglich sein, müßte die Auszählung des eingestellten Gesichtsfeldes durch den Beobachter selbst im Mikroskop erfolgen.

(2) die Notwendigkeit der Auszählung einer größeren Anzahl von mikroskopischen Gesichtsfeldern erfordert einen automatischen Präparateschlitten am Mikroskop sowie eine Autofocuseinrichtung, die das Objektiv immer so zur Objektebene stellt, daß ein scharfes Bild entsteht.

(3) als weitere Ausstattung ist auf dem Mikroskop eine geeignete TV-Röhre zu installieren, die das mikroskopische Bild auf einen Monitor projiziert und gleichzeitig die in ihm enthaltenen Informationen an einen Computer weitergibt, der nach einem bestimmten Programm die Auswertung der Daten übernimmt.

Die Bereitstellung einer geeigneten "Software" allein für die Auszählung abgebildeter Partikel stellt ein weiteres Problem dar. In den Programmen von konsultierten Herstellerfirmen ist sie zwar enthalten. Diese sind jedoch zur Lösung weitaus komplexerer Aufgaben befähigt und daher würde die Übernahme eine instrumentelle Überausstattung darstellen. Nach den Angaben einer der Firmen würde die Erstellung einer speziellen Software bei einer Einzelanfertigung circa 30.000,- DM kosten.

Für die Erfassung der mikroskopischen Gesamtkeimzahl mit Hilfe automatischer Auswertersysteme entstehen nach dem Stand der Technik des Jahres 1982 und nach dem Angebot eines von drei konsultierten Herstellern somit Investitionskosten, die nicht unter DM 100.000,- liegen. Der Zeitaufwand für die Auswertung eines Filters würde dabei allerdings unter einer Minute liegen, was eine enorme Zeitersparnis darstellt. Eine Begrenzung der Anzahl Proben durch die Ermüdbarkeit des Untersuchers wäre ebenfalls nicht mehr gegeben. Durch die mögliche Erhöhung auch der Anzahl ausgezählter mikroskopischer Gesichtsfelder ließe sich außerdem die Aussagekraft der angewandten Untersuchungstechnik noch besser darstellen. Zu klären ist bei verschiedenen und neuartigen Anwendungsbereichen jeweils, ob die Aussagekraft der mikroskopischen Gesamtkeimzahl für den Untersuchungsbereich, d.h., Proben aus einem bestimmten Biotop, zutreffend ist. Für die hier untersuchte Keimflora der Oberfläche von Fleisch traf dieses vertretbar zuverlässig zu.

V.7. Wertbestimmende Merkmale des Epifluoreszenzverfahrens

Die Bezeichnung "Schnellmethode" für die Epifluoreszenztechnik ist auch ohne den Einsatz automatischer Bildauswerter gerechtfertigt. Addiert man die Zeiten von der Probenahme bis zum Ergebnis, so kann eine Aussage über den Keimgehalt des Probesubstrates innerhalb einer Stunde getroffen werden. Dabei kann in einem mikroskopischen Untersuchungsgang sowohl die Gesamtkeimzahl der Probe als auch der Anteil atmender, d.h. lebensfähiger Mikroorganismen ermittelt werden. Dies gilt sowohl für Abtrage- als auch für Abspülproben von Fleischoberflächen. Bei letzteren ist durch die weniger aufwendige Verarbeitung des Probenmaterials eine noch kürzere Untersuchungs-

dauer möglich. Dabei nimmt die 20minütige Inkubationszeit der Proben mit dem Tetrazoliumsals INT zum Nachweis der Atmungsaktivität der Zellen noch einen wesentlichen Teil der benötigten Zeit in Anspruch. Bei einer Untersuchung allein auf die mikroskopische Gesamtkeimzahl entfielen dieser Zeitfaktor, so daß die Untersuchungszeit auf circa eine halbe Stunde reduziert wird.

Vorteilhaft gegenüber der klassischen mikroskopischen Keimzählung in Zählkammern, die teilweise in neuerer Zeit nochmals auf ihre Einsetzbarkeit als Schnellmethode geprüft wurde (BEM et al., 1976; STRASSER, 1979), ist die Ausschaltung der Eigenbeweglichkeit der Bakterienzellen auf dem Filter sowie die gleichmäßige Verteilung und damit die gute Identifizierungsmöglichkeit der fluoreszierenden Keime, die selbst gegenüber mitangefärbten Beimengungen aus der Probe einen gut wahrnehmbaren Kontrast darstellen.

Die Auswertung der Filterpräparate stellt auch für im Mikroskopieren wenig geübte Beobachter kein Problem dar, wie es bei der Überprüfung des Verfahrens durch 2 verschiedene Personengruppen verdeutlicht werden konnte. Die anhand zweier Filterpräparate kurzfristig eingearbeiteten Untersucher hatten keine Schwierigkeiten, fluoreszierende Mikroorganismen von dem sie umgebenden Detritus auf dem Filter zu unterscheiden. Auch die Abgrenzung ETS-positiver von ETS-negativen Keimen wurde sowohl in vorgegebenen als auch in selbstgewählten mikroskopischen Gesichtsfeldern zufriedenstellend gelöst.

Die Möglichkeit, die Filterpräparate länger als ein Jahr lang zu lagern, ohne daß ein Verlust der Fluoreszenzintensität angefärbter Keime oder eingelagerter Formazangranula auftritt, stellt einen weiteren Vorteil des Verfahrens dar. Die Filter stehen dadurch für lange Zeiträume zu Dokumentations- und Demonstrationszwecken zur Verfügung, ohne an Qualität oder Aussagekraft zu verlieren. Ein anderer Vorteil ergibt sich aus der Möglichkeit, Photographien der mikroskopischen Präparate anzufertigen, auch auf dem Wege über die Sofortbild-Dokumentation.

Das Fluoreszenzvermögen auch durch Autoklavieren abgetöteter Keime eröffnet schließlich einen Weg, unzulässig hohe Keimkonzentrationen in Ausgangsmaterialien von Lebensmitteln nachzuweisen, die durch eine Hitzebehandlung verkehrsfähig gemacht wurden. Allerdings muß hierzu noch vergleichend geprüft werden, wie hoch die Verlustraten nachweisbarer fluoreszierender Zellen nach dem Autoklavieren sind.

Durch untersuchte Proben von Hackfleisch, beimpften und angereicherten Fleischkonserven und Rohwurst konnte die Anwendbarkeit der Epifluoreszenzmethode auch für diese Fleischprodukte orientierend nachgewiesen werden.

Für die Einsatzfähigkeit der Auflichtfluoreszenzmikroskopie eröffnet sich also allein auf dem Gebiet der Fleischmikrobiologie ein weites Feld, das sicher auch auf andere Lebensmittel auszudehnen ist. Voraussetzung ist nur, daß ein entsprechend hoher Keimgehalt vorliegt. Die untere Grenze für gut reproduzierbare Werte pro g oder pro cm² Probe liegt bei etwa 1×10^7 . In höheren Bereichen werden die Korrelationen mit kulturellen Werten noch besser.

VI. S c h l u ß f o l g e r u n g e n

1. Eine Charakterisierung von Mikroorganismen nach lebenden und abgestorbenen Zellen allein aufgrund der Farbe der emittierten Fluoreszenzstrahlung ist nicht möglich. Ein aktives respiratorisches System als Zeichen der Lebensfähigkeit ist hingegen in Form eingelagerter Formazangrانا selbst in den kugelförmigen Zellen der Kokken nachweisbar.

2. Zwischen der Fähigkeit zur Koloniebildung von Reinkulturen der Hauptrepräsentanten der Fleischflora und dem mikroskopischen Nachweis eines aktiven Elektronentransportsystems besteht ein enger Zusammenhang. Dieser ist in der logarithmischen Vermehrungsphase der Keime am größten. In der Absterbephase der Kulturen wird er abgeschwächt, da eine Atmungsaktivität auch noch in Zellen alter Kulturen nachweisbar ist, die nicht mehr volle Anwachsrate ergeben.

3. Für die Untersuchung nativer Proben (Abtrage- und Abspülproben von Fleischoberflächen) mit erheblicher Eiweißbelastung und damit Fremdfluoreszenz ist zur Beseitigung von nichtmikrobiellen Beimengungen eine Vorfiltration erforderlich. Dabei treten Keimzahlverluste auf, die von dem Grade der Belastung der Proben abhängig sind. Die Reduzierung der Keimzahlen durch die Vorfiltrierung ist daher bei Abtrageproben größer als bei Abspülproben. In den untersuchten Keimzahlbereichen sind die auftretenden Verluste jedoch vernachlässigbar.

4. Die Vorfiltrate der Abtrageproben von Fleisch müssen aufgrund noch verbliebener Beimengungen vor ihrer mikroskopischen Auswertung noch einmal auf 10 verdünnt werden. Filtrate von Abspülproben können hingegen direkt untersucht werden, eine Aussage ist daher schon bei 10fach niedrigerem Keimgehalt als in Abtrageproben möglich. Andererseits wird bei Abspülproben der üblichen Technik auch nur etwa ein Viertel des vorhandenen Oberflächenkeimgehaltes gewonnen.

5. Ab einer Ausgangsbelastung von 5×10^6 Keimen pro ml Spülprobe respektive 1×10^7 pro ml Homogenisat werden Keimdichten im Filtrat er-

zielt, die aussagekräftige Ergebnisse ermöglichen.

6. Eine zufällige Verteilung der Mikroorganismen auf dem Polycarbonatfilter ist bei einer durchschnittlichen Keimdichte von 10 Zellen pro mikroskopischem Gesichtsfeld anzunehmen. Dies entspricht einem Keimgehalt von 5×10^5 pro ml filtrierter Probe. Mit der Auszählung von 10 mikroskopischen Gesichtsfeldern von insgesamt 51.611 möglichen ist aufgrund der biome-trischen Auswertung umfangreicher Voruntersuchungen eine repräsentative und zuverlässige Aussage über den Keimgehalt der Probe zu treffen.

7. In einem Untersuchungsgang kann sowohl die mikroskopi-sche Gesamtkeimzahl als auch der Anteil atmender Mikroorganismen ermittelt werden. In nativen Proben ist die Korrelation der mikroskopischen Gesamt-keimzahl mit der Anzahl ETS-positiver Zellen im gesamten untersuchten Keim-zahlbereich sehr eng. Eine Beurteilung der Mikroflora von Fleischoberflächen kann daher auch anhand der Gesamtzahl fluoreszierender Zellen getroffen werden.

8. Eine Aussage über die mikroskopische Gesamtkeimzahl ist innerhalb einer halben Stunde, eine Aussage über diese und zusätzlich über die Anzahl atmungsaktiver Keime innerhalb einer Stunde zu treffen.

9. Die Auswertung der Proben ist an ein Labor gebunden. Sie kann von kurzfristig eingearbeitetem Personal übernommen werden. Die Untersuchung muß in einem abgedunkelten Raum vorgenommen werden, das Mikro-skop soll erschütterungsfrei aufgestellt sein. Nach einer Stunde Untersuchungs-zeit muß eine Erholungspause eingelegt werden. In diesem Zeitraum sind bei einer Abgrenzung ETS-positiver von ETS-negativen Zellen durchschnittlich 6 Filterpräparate auszuwerten, hingegen 12 bei alleiniger Betimmung der Gesamt-zahl fluoreszierender Keime.

10. Eine automatische Auswertung der Filterpräparate ist unter alleiniger Erfassung der Gesamtkeimzahl möglich. Eine Unterscheidungs-möglichkeit zwischen ETS-positiven und ETS-negativen Zellen ist dabei nicht gegeben. Die Investitionskosten für eine solche Anlage sind hoch. Die Redu-zierung der Auswertezeit auf weniger als eine Minute pro Filter sowie der

Wegfall eines Ermüdungseffektes lassen eine solche Anschaffung für routinemäßige Untersuchungen jedoch sinnvoll erscheinen.

VII.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Eine hohe Keimzahlbelastung von Fleischoberflächen ist ein limitierender Faktor für die Verarbeitung des Fleisches zu verkehrsfähigen Lebensmitteln. Die Ermittlung eines nicht mehr tolerierbaren Ausgangsmaterials mit klassisch bakteriologischen Arbeitsmethoden ist im Rahmen der normalen Fleischverarbeitung und des Handels aus Zeitgründen kaum möglich. Deshalb wurde im Rahmen eines Forschungsvorhabens über "anwendbare Schnellmethoden" die direkte Keimnachweismethode durch Epifluoreszenzmikroskopie im Vergleich zum herkömmlichen Kulturverfahren geprüft. Ein aktives Elektronen-Transport-System (ETS) in den Mikroorganismen wurde als Kennzeichen für die Atmungs-fähigkeit der Keime und damit der Vermehrungsfähigkeit angesehen.

Die prinzipielle Anwendbarkeit des Verfahrens konnte durch vergleichende Untersuchungen zu den kulturellen Methoden des Drop plating- und des Spatel-Verfahrens an Reinkulturen von 12 repräsentativen Stammformen der Fleischflora (Lactobacillaceae, Pseudomonadaceae, Micrococcaceae, Enterobacteriaceae, Moraxella-Acinetobacter-Gruppe) bestätigt werden. Der Nachweis der respiratorischen Aktivität der Mikroorganismen (Elektronentransport-system = "ETS-positiv") erfolgte mit einem Tetrazoliumsalz, welches von den Keimen verstoffwechselt und eingelagert wurde und dann in Form dunkler Gra-nula in den Zellen lichtmikroskopisch nachweisbar war. Die Proben wurden durch Nuclepore^R-Filter filtriert, mit Acridinorange-Lösung angefärbt und die luftgetrockneten Filter auf Objektträgern in "Cargille LF"-Immersionsöl ein-gebettet und unter einem Deckglas bei 1000facher Vergrößerung mit Ölimmer-sion im Auflichtfluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Photodokumentation stand wahlweise eine Sofortbildkamera (für schwarz-weiße Polaroid-Aufnahmen) oder eine automatische Filmkassette für farbige Diapositive zur Verfügung.

Es wurde eine "Blau"-Anregungsstrahlung verwendet, die die Keime grün bis orangerot fluoreszieren ließ. Durch Hinzuschaltung normalen Durchlichtes geringer Intensität wurde eine bessere Darstellung der in den Mikroorganismen eingelagerten Formazangranula erreicht. Eine Unterscheidung in lebende und tote Keime durch die Farbe des emittierten Fluoreszenzlichtes war nicht möglich. Diese Bestimmung wurde ausschließlich anhand eingelagerter

Formazangranula (ETS+) durchgeführt.

Die Aussagekraft jeweils 10 ausgezählter mikroskopischer Gesichtsfelder von 51.611 möglichen pro Filter wurde durch eine biometrische Auswertung bestätigt. Dazu waren je 200 Gesichtsfelder auf zwei Filtern mit durchschnittlichen Keimdichten von 67 bzw. 9 Mikroorganismen pro Gesichtsfeld ausgezählt und auf ihre statistische Aussagekraft hin untersucht worden. Bei 67 Keimen pro Gesichtsfeld war eine Repräsentanz der Einzelwerte für die gesamte Probe auf Grund der Verklumpungseffekte nicht gegeben, bei durchschnittlich 9 Keimen pro Gesichtsfeld war eine zutreffende Aussage möglich. Die weiteren Untersuchungen bestätigten die aufgrund der Voruntersuchungen getroffenen Aussagen.

Die Korrelationen der Werte der kulturellen Verfahren zu den ETS-positiven Mikroorganismen betrugen $r=0,95$ für das Spatel-Verfahren und $r=0,94$ für das Drop plating-Verfahren. In der logarithmischen Vermehrungsphase der Mikroorganismen war der Zusammenhang am besten, in der Absterbephase trat eine Abschwächung auf, da eine Atmungsaktivität auch noch in Zellen nachweisbar war, die nicht mehr kulturell vermehrungsfähig waren.

Die mikroskopische Gesamtkeimzahl zeigte bei den Reinkulturen insgesamt eine enge Korrelation zu der Anzahl ETS-positiver Zellen auf ($r=0,99$). Durch die zahlenmäßige Überlegenheit ETS-negativer Zellen in der lag-Phase der Kulturen traten in einem Keimbereich bis zu 5×10^6 /ml höhere Streuungen auf. Alle Proben der Reinkulturesuspensionen waren direkt, d.h. ohne vorherige Reinigung, auswertbar. Ein aussagekräftiges Ergebnis war ab einer Zellzahl von 5×10^5 /ml flüssiges Kulturmedium zu erzielen.

Als native Proben dienten die flüssigen Phasen der aus Abtrageproben hergestellten Fleischhomogenisate und die mit einem Abspülgerät gewonnenen Spülflüssigkeiten von Oberflächen von 3 bis 7 Tage alten, gekühlten Rinderschlachthälften. Bei der Abtrage Technik wurden 20 cm^2 des *M. gracilis* circa 1 bis 2 mm tief abgetragen, abgespült wurden ebenfalls 20 cm^2 des gleichen Muskels. Vor der mikroskopischen Auswertung war eine Reinigung

durch Vorfiltration über Glasfaserfilter erforderlich, die mit einem Detergens benetzt worden waren. Eine zufällige Reduzierung und Erhöhung der Zellzahl durch dieses Verfahren ergab sich in allen Keimzahlbereichen der Spülproben sowie der Abtragehomogenisate. Kulturelle Vergleiche zwischen unfiltrierten und filtrierten Abtrageproben wiesen eine höhere Streuung als für Abspülproben auf.

Für Abtrage- und Spülproben wurden Zusammenhänge zwischen Koloniezahlen und ETS-positiven Keimen pro ml mit $r=0,92$ errechnet. Nach Unterteilung der Werte in drei Keimzahlbereiche ($\leq 5 \times 10^6$; $\leq 5 \times 10^7$; $> 5 \times 10^7$ Cfu/ml Homogenisat oder Spülflüssigkeit) ergaben sich im zweiten und dritten Bereich bei den Abspülproben bessere Übereinstimmungen als bei den Abtrageproben. Spülproben konnten direkt nach der Vorfiltration, Abtrageproben erst nach weiterer 10 facher Verdünnung auf die Nuclepore^R-Filter aufgebracht werden. Daraus ergab sich eine Aussagemöglichkeit für Abspülproben schon bei 10 fach niedrigerem Keimgehalt bei zudem besserer Qualität der mikroskopischen Präparate. Allerdings konnte mit der Spültechnik nur etwa ein Viertel der Oberflächenflora gewonnen werden. In fleischhygienisch bedenklichen Keimzahlbereichen ($> 1 \times 10^7$ Cfu/cm² Fleischoberfläche) war mit beiden Probearten innerhalb einer Stunde ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen. Unterhalb dieser Keimzahlgrenze war im Vergleich zum kulturellen Verfahren keine genügend reproduzierbare Aussage zu treffen. Ein Vergleich der mikroskopischen Gesamtkeimzahlen mit der Anzahl ETS-positiver Zellen ergab einen sehr engen Zusammenhang von $r=0,99$ über den gesamten untersuchten Keimzahlbereich hinweg, woraus sich ableiten ließ, daß die Höhe der Gesamtkeimzahl in Proben von Fleischoberflächen stark von der Höhe der Anzahl lebender Keime geprägt ist.

Das Auflichtfluoreszenzverfahren ist bestimmten Voraussetzungen unterworfen. Außer den Kosten für die Anschaffung eines Auflichtfluoreszenzmikroskopes oder einer Zusatzeinrichtung zum vorhandenen Mikroskop müssen einzelne methodisch limitierende Faktoren berücksichtigt werden:

(1) Die Vorfiltration der Proben zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz bei viel Fremdpartikeln, die einen Keimverlust, insbesondere bei Abtrageproben nach sich ziehen kann. (2) Die Notwendigkeit einer zusätzlichen Filteranfertigung bei zu hoher oder zu niedriger auszuwertender Keimzahl pro Gesichtsfeld. (3) Die Ermüdbarkeit des Untersuchers bei manueller Auswertung: maximal 6 Filter pro Stunde bei Unterscheidung von ETS-positiven und ETS-negativen Keimen und 12 Filter bei Erfassung der mikroskopischen Gesamtkeimzahl, mit anschließender Pause von 15 min.

Mit automatischen Bildauswertersystemen, die den Ermüdungseffekt aufheben würden, kann nur die Gesamtzahl fluoreszierender Keime bestimmt werden, ausgenommen ebenso Zellen, die eine Rot- oder Grünfluoreszenz zeigen und für den Apparat nicht erfaßbar sind, weil sie sich in ihrer Helligkeit zu wenig vom Filterhintergrund abheben. Diese Einschränkungen scheinen für native Proben von Fleischoberflächen nicht bedeutsam zu sein, da die Gesamtkeimzahl auffällig gut mit der Anzahl ETS-positiver Mikroorganismen korrelierte und der Anteil der Keime, die eine Rot- oder Grünfluoreszenz zeigten, verschwindend gering war.

Die Gesamtkeimzahl konnte mit der Auflichtfluoreszenzmikroskopie auch bei hitzesterilisierten Fleischproben bestimmt werden. Die Bakterienzellen waren mit Acridinorange auch nach ihrer Abtötung gut darstellbar. Über eventuelle Verlustraten nachweisbarer Zellen durch den Hitzeprozeß können hingegen noch keine ausreichenden Angaben gemacht werden.

VIII.

S u m m a r y

High levels of bacteria on meat surfaces are a limiting factor for the production of acceptable food. Cultural detection methods which are based on counting colony forming units (cfu) are time consuming and can hardly satisfy the requirements of modern food production. On this account the direct enumeration of bacteria by epifluorescence microscopy was compared to cultural methods. The proof of an active electron-transport-sys-tem (ETS) in the bacteria was regarded as a visible sign of ability of reproduction, 12 representative bacterial strains of the meat flora were examined to show a principal applicability of the method (Lactobacillaceae, Pseudomonadaceae, Micrococcaceae, Enterobacteriaceae, and Moraxella-Acinetobacter). Respiratoric activity was determined by incubating the samples with an aqueous solution of INT(iodophenyl-nitrophenyl-tetrazolium chloride). Respiring bacteria reduces INT to INT-formazan and deposit accumulated INT-formazan intracellularly as dark spots which allows them to be examined by microscopy. Samples were filtered through 0.2 μ m pore size Nuclepore^R filter membranes and stained with acridin orange solution. Air dried filters were embedded in "Cargille LF" immersion oil and examined by epifluorescence microscopy, using an oil immersion objective, total magnification was 1000x. A blue exitation light of 450-490 nm wavelength was applied. The stained bacteria showed a fluorescence of green, yellow, orange, and red light. When both fluorescence and transmitted light were applied, formazan spots in the bacteria were often to discover easier. It has not been possible to distinguish between living and dead cells by the colour of emitted fluorescence light, only accumulated formazan spots were regarded as a sign of metabolic activity.

Statistical analyses of two filters were performed to demonstrate the representative assertion of ten counted microscopic fields from 51,611 possible on one filter. On each filter 200 microscopic fields were counted with an average of 67 cells per field on the first one, and 9 cells respectively. It could be noticed that on filters with more than 10 cells per field clumping effects between bacteria may occur which compromise representative results.

Correlations between cultural methods and the number of ETS-positive microorganisms of $r=0.94$ for drop plating and $r=0.95$ for spatula-plating were achieved for pure cultures. Correlation was best during the logarithmic growth phase. In senescent phase of growth a weakening occurred due to the fact, that respiratoric activity is even detectable in cells which showed no more growth on cultural media. The number of respiring bacteria showed close correlations ($r=0.99$) to the total microscopic cell count. Only during the lag-phase of the pure cultures up to 5×10^6 cells per ml this correlation was weakened because of high rates of ETS-negative bacteria. All these samples could be examined directly in the microscop, without having been purified before. Valid results were obtained from 5×10^5 cells per ml liquid culture medium.

20 cm² of the *m. gracilis* of beef carcasses, which had been chilled for 3 to 7 days were used as native samples. The area was either rinsed or taken off to a depth of 1 to 2 mm. To separate debris, the rinsing liquids and the liquid phases of produced meat homogenisates were prefiltered with spun glass filters which were wetted with a surfactant before use. Filtered and unfiltered samples were compared culturally as to exclude falsifying reductions of cell numbers by this purification. In rinsing liquids as well as in liquid phases of homogenisates no systematic effects on the obtained number of colonies could be observed. The variation is characterized by the standard deviation ($s_{y \cdot x} = 0.51$ for rinsing liquids, and $s_{y \cdot x} = 0.64$ for homogenisates).

Comparison of the numbers of ETS-positive microorganisms and cfu in prefiltered liquids yielded correlation of $r=0.92$ for both kinds of samples. The classification of the obtained numbers of cfu/ml in three ranges ($\leq 5 \times 10^6$; $\leq 5 \times 10^7$; $> 5 \times 10^7$) showed better relations for rinsed samples especially in the second and third range. Rinsing liquids could be examined directly after prefiltration, liquid phases of homogenisates had to be diluted 10x for epifluorescence purposes. Thus, bacteria in rinsing liquids could be detected at levels 10x lower than in homogenisates, furthermore the obtained microscopic image was of better quality. It had to be considered that the number of bacteria gained by rinsing the meat surface,

represents almost a quarter of actual contamination. When contamination exceeded the limits of bearable numbers of cfu on the meat surfaces ($> 1 \times 10^7 / \text{cm}^2$) representative results could be obtained within one hour with both samples, rinsing liquids and liquid phases of meat homogenisates. The obtained data were not comparable with cultural results below this limit.

Comparing the numbers of ETS-positive bacteria with the total microscopic cell count in native samples a close correlation ($r=0,99$) was achieved for the whole cell-range examined. Thus, the total number of bacteria clearly was subjected to the number of respiring cells.

Epifluorescence microscopy is subjected to certain assumptions. Besides technical equipment, methodical limiting facts have to be considered. (1) Prefiltration of the samples for reducing background fluorescence may cause cell reduction, especially in liquid phases of meat homogenisates up to contamination ranges of 1×10^7 cfu/ml. (2) Should the number of cells on Nuclepore^R filter turn out to be too high or too low for microscopic counting it is necessary to prepare a second one. (3) Manual examination is rather wearisome for the investigator. A maximum of 6 filters can be evaluated per hour, including the differentiation between ETS-positive and ETS-negative cells, 12 filters respectively when only the counting of the total number of fluorescing cells is demanded, a following break of 15 minutes is necessary for the recovery.

Automatic image analysers can neutralize this tiring effect, but only the total number of fluorescing bacteria can be counted. Cells of green or red fluorescence would not be counted because of the poor contrast towards the filter background. As the number of ETS-positive bacteria show a close correlation to the total number of fluorescing cells in native samples, these restrictions seem to be bearable. The quantity of cells with a red or a green fluorescence was of no importance.

Total counts of fluorescing bacteria were also realized in autoclaved meat samples. The heat-killed germs also could be presented very well after having been stained with the fluorochrome acridin orange. A possible loss of detectable cell numbers, caused by autoclaving the samples, have not yet been evaluated satisfactory.

IX. A n h a n g

Tabellen: 3-14
 18-24

Abbildungen: 5-9a

Tab.3-14:

Kulturell (Cfu) und mikroskopisch erzielte Einzelbefunde
jeweils zweier Versuchsansätze von Reinkulturen unter

Tab.3

Berücksichtigung der Wachstumsphase

Testkeim und Stammbezeichnung:			$\log_{10}$				
Moraxella non liquefaciens CCM 5604			Cfu /ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstums- phase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatel- verfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag- Phase	0	1	5,57	5,57	5,32	5,71	5,86
		2	4,20	4,43	5,04	5,08	5,36
	2	1	5,43	5,72	5,61	5,15	5,74
		2	4,04	4,43	5,08	5,42	5,58
	4	1	5,81	6,11	5,36	5,82	5,95
		2	5,15	5,57	5,40	5,04	5,56
	6	1	6,26	6,59	6,91	6,69	7,11
		2	5,34	5,54	6,38	6,08	6,57
	16	1	6,49	6,57	7,58	7,43	7,81
		2	7,28	7,42	7,59	7,36	7,79
logarithmische Vermehrungsphase	18	1	6,53	6,61	7,61	7,76	7,99
		2	7,23	7,46	7,64	7,57	7,90
	20	1	6,56	6,72	7,58	7,76	7,98
		2	7,26	7,59	7,76	7,36	7,90
	24	1	6,04	6,18	7,11	7,64	7,76
		2	7,83	7,87	7,73	7,79	8,08
	48	1	5,15	5,32	6,86	7,81	7,85
		2	7,84	7,86	8,20	8,30	8,56
stationäre bzw. Absterbephase							

ETS + : Elektronentransportssystem - positiv

ETS - : Elektronentransportssystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.4

Testkeim und Stammbezeichnung:			log ₁₀				
Acinetobacter anitratus NCTC 7844			Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstumsphase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spateilverfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag-Phase	0	1	5,72	5,58	4,86	5,92	5,95
		2	4,54	4,49	5,11	5,48	5,63
	2	1	6,20	6,28	6,11	6,78	6,86
		2	4,94	4,95	5,38	5,59	5,80
logarithmische Vermehrungsphase	4	1	6,96	6,96	5,97	6,89	6,94
		2	5,43	5,45	5,72	5,99	6,18
	6	1	7,04	7,04	6,46	7,08	7,18
		2	6,34	6,30	6,64	7,08	7,20
	16	1	7,04	6,98	7,11	7,88	7,95
		2	7,04	6,89	7,53	7,77	7,97
	18	1	7,18	7,11	7,32	7,67	7,83
		2	7,04	7,04	7,49	7,76	7,94
	20	1	7,23	7,30	7,26	7,85	7,94
		2	7,04	7,04	7,45	7,69	7,89
	24	1	7,45	7,46	7,40	7,88	8,00
		2	7,18	7,18	7,53	7,74	7,95
stationäre bzw. Absterbephase	48	1	7,43	7,41	7,43	8,15	8,23
		2	7,32	7,34	7,57	7,98	8,11
	72	1	7,75	7,72	7,72	8,41	8,49
		2	7,63	7,49	7,79	8,11	8,28

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.5

Testkeim und Stammbezeichnung: Lactobacillus plantarum I R 43 e (a)			$\log_{10}$				
			Cfu /ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstums- phase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatei- verfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag- Phase	0	1	4,97	4,98	4,99	5,36	5,52
		2	4,84	4,92	6,32	6,30	6,61
	2	1	4,99	5,32	5,08	5,30	5,51
		2	4,79	4,79	6,32	6,11	6,53
	4	1	5,15	5,48	5,78	5,38	5,92
		2	5,93	5,97	6,30	6,36	6,63
	6	1	5,75	6,04	5,98	5,72	6,13
		2	6,23	6,36	6,57	6,43	6,81
	16	1	8,08	8,20	8,61	8,65	8,93
		2	6,30	6,43	6,76	7,04	7,23
	18	1	9,08	9,08	8,99	8,72	9,18
		2	6,67	7,00	7,49	7,74	7,93
stationäre bzw. Absterbephase	20	1	9,23	9,28	9,11	8,94	9,34
		2	7,23	7,41	7,36	7,84	7,96
	24	1	8,54	8,57	8,99	8,56	9,11
		2	7,89	8,20	8,40	8,76	8,91
	48	1	9,04	9,20	8,93	8,89	9,20
		2	8,28	8,34	8,76	9,08	9,26
	72	1	7,28	7,36	8,99	9,00	9,30
		2	8,28	8,28	8,71	9,11	9,26

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.6

Testkeim und Stammbezeichnung:			log ₁₀				
Streptococcus faecalis var. faecalis 11640, Kiel 78			Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstums- phase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatel- verfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag- Phase	0	1	5,54	5,57	5,40	6,00	6,08
		2	4,86	4,91	5,43	4,94	5,56
	2	1	5,88	5,93	5,72	4,32	5,73
		2	5,51	5,88	6,08	5,38	6,15
	4	1	6,85	6,93	6,74	6,40	6,90
		2	7,18	7,51	7,64	7,74	8,00
	6	1	7,43	7,48	7,81	7,68	8,04
		2	8,11	8,41	8,04	7,83	8,26
	16	1	8,11	8,08	8,46	8,76	8,93
		2	8,23	8,53	8,36	8,72	8,88
Logarithmische Vermehrungsphase	18	1	8,00	8,00	7,80	8,28	8,40
		2	8,15	8,51	8,29	8,82	8,93
	20	1	8,18	8,11	8,42	8,80	8,95
		2	8,28	8,60	8,58	9,08	9,20
	24	1	7,85	7,94	7,89	8,73	8,79
		2	8,20	8,54	8,43	8,99	9,11
	48	1	7,40	7,28	7,46	8,54	8,58
		2	8,49	8,79	8,36	8,94	9,04
	72	1	7,28	7,15	7,53	8,54	8,58
		2	8,34	8,52	8,59	8,97	9,11
stationäre bzw. Absterbephase							

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.7

Testkeim und Stammbezeichnung:			$\log_{10}$				
Pseudomonas taetrolens 5/9 Kielwein			Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstums- phase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatel- verfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag- Phase	0	1	3,56	3,61	4,72	5,08	5,23
		2	4,66	4,56	4,61	5,45	5,51
	2	1	4,04	4,34	4,79	5,18	5,32
		2	4,48	4,54	4,72	5,45	5,52
	4	1	4,61	4,49	5,30	5,83	5,94
		2	5,20	5,11	5,15	5,85	5,92
	6	1	4,64	4,51	5,46	5,92	6,04
		2	5,08	5,46	5,23	5,93	6,00
	16	1	6,72	6,58	7,30	7,04	7,49
		2	6,91	6,84	7,54	7,48	7,81
	18	1	7,28	7,00	7,72	7,23	7,85
		2	7,04	6,73	7,40	7,76	7,92
logarithmische Vermehrungsphase	20	1	7,23	7,28	7,69	7,43	7,88
		2	6,99	6,84	7,81	7,81	7,94
	24	1	7,23	7,23	7,79	7,34	7,92
		2	6,83	6,79	7,67	7,26	7,81
	48	1	8,18	7,96	8,08	7,70	8,23
		2	7,08	7,11	7,71	7,41	7,89
	72	1	8,63	8,11	8,83	8,40	8,96
		2	7,15	7,20	7,60	7,43	7,83
stationäre bzw. Absterbephase							

ETS + : Elektronentransportssystem - positiv

ETS - : Elektronentransportssystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.8

Testkeim und Stammbezeichnung:			$\log_{10}$					
Pseudomonas speziez I			Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)			
7/0 Kielwein								
Wachstums- phase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatel- verfahren	Epifluoreszenz			
					ETS +	ETS -	Σ	
lag- Phase	0	1	3,59	3,69	4,76	4,99	5,20	
		2	4,77	5,11	4,87	5,59	5,67	
	2	1	3,88	4,08	4,76	5,18	5,32	
		2	4,86	5,30	5,04	5,79	5,86	
logarithmische Vermehrungsphase	4	1	4,61	4,51	5,23	5,64	5,79	
		2	5,67	5,88	6,30	6,41	6,66	
	6	1	4,62	4,56	5,38	5,83	5,96	
		2	5,92	6,00	6,63	6,88	7,08	
	16	1	6,79	6,76	7,23	6,98	7,43	
		2	7,20	7,20	7,84	7,57	8,04	
	18	1	7,26	7,08	7,69	7,28	7,83	
		2	7,11	7,15	7,65	7,82	8,04	
	20	1	7,26	7,28	7,69	7,43	7,88	
		2	7,32	7,28	7,85	7,30	7,95	
	24	1	7,18	7,23	7,81	7,30	7,92	
		2	7,53	7,48	8,00	7,63	8,15	
	48	1	8,32	8,15	8,08	7,75	8,26	
		2	7,71	7,80	8,68	8,45	8,88	
	stationäre bzw. Absterbephase	72	1	8,36	8,34	8,70	8,56	8,93
			2	7,58	7,52	8,40	8,88	9,00

ETS + : Elektronentransportssystem - positiv

ETS - : Elektronentransportssystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.9

Testkeim und Stammbezeichnung:			$\log_{10}$				
Pseudomonas fluorescens 665/70 BGA			Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstums- phase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatel- verfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag- Phase	0	1	4,72	4,88	4,79	5,48	5,56
		2	4,94	4,71	4,79	5,59	5,65
	2	1	4,88	4,97	5,08	5,73	5,82
		2	5,23	5,15	4,72	5,70	5,74
	4	1	5,66	5,76	6,15	6,54	6,69
		2	5,77	5,34	5,08	6,04	6,08
	6	1	5,77	5,89	6,64	6,86	7,08
		2	6,11	5,85	6,11	6,54	6,68
	16	1	7,28	7,40	7,84	7,43	7,98
		2	7,32	7,23	7,62	7,49	7,86
Logarithmische Vermehrungsphase	18	1	7,26	7,15	7,71	7,83	8,08
		2	7,23	7,20	7,73	7,46	7,92
	20	1	7,32	7,46	7,86	7,46	8,00
		2	7,45	7,34	7,84	7,48	8,00
	24	1	7,54	7,40	7,79	7,73	8,08
		2	7,15	7,15	7,56	7,84	8,04
	48	1	7,72	7,73	8,26	8,49	8,69
		2	7,45	6,95	7,97	7,61	8,15
	72	1	7,59	7,69	8,43	8,89	9,04
		2	7,38	7,15	8,04	7,88	8,28
stationäre bzw. Absterbephase							

ETS + : Elektronentransportssystem - positiv

ETS - : Elektronentransportssystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.10

Testkeim und Stammbezeichnung:			$\log_{10}$				
Micrococcus luteus CCM 169 TU München 79			Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstumsphase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatelverfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag-Phase	0	1	4,95	5,08	5,38	4,94	5,52
		2	5,28	5,36	5,94	5,49	6,08
	2	1	6,20	6,40	6,04	5,69	6,20
		2	5,51	5,49	5,94	5,76	6,18
	4	1	7,91	8,00	7,78	7,86	8,11
		2	6,56	6,93	6,76	6,61	7,00
logarithmische Vermehrungsphase	6	1	8,53	8,60	8,11	8,04	8,38
		2	7,23	7,61	7,54	7,62	7,89
	16	1	9,04	9,23	8,98	8,72	9,18
		2	7,59	8,08	7,92	8,18	8,36
	18	1	8,74	9,08	8,84	8,67	9,08
		2	7,91	7,93	8,08	8,28	8,49
	20	1	9,08	9,18	8,89	8,91	9,20
		2	7,96	8,26	7,89	8,08	8,30
	24	1	9,00	9,15	8,81	8,99	9,20
		2	7,58	7,84	7,87	8,34	8,46
stationäre bzw. Absterbephase	48	1	9,00	9,23	8,52	9,00	9,11
		2	7,11	7,48	7,92	8,46	8,57
	72	1	8,85	8,69	8,57	8,80	9,00
		2	6,53	7,15	8,36	8,77	8,91

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.11

Testkeim und Stammbezeichnung:			$\log_{10}$				
Staphylococcus aureus ATCC 6538			Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstums- phase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatel- verfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag- Phase	0	1	5,36	5,32	5,89	6,11	6,32
		2	4,94	5,18	5,54	5,38	5,77
	2	1	6,04	5,59	6,48	6,49	6,79
		2	6,04	6,30	6,49	6,23	6,68
	4	1	7,20	7,15	7,66	7,45	7,87
		2	7,80	8,08	7,81	7,64	8,04
	6	1	8,11	7,98	8,15	7,96	8,36
		2	8,36	8,49	8,08	7,77	8,26
	16	1	8,69	8,75	8,95	9,08	9,32
		2	8,79	8,88	9,04	8,74	9,23
stationäre bzw. Absterbephase	18	1	8,69	8,83	9,08	8,97	9,32
		2	8,68	8,72	9,11	8,96	9,34
	20	1	8,77	8,92	8,91	8,97	9,26
		2	8,26	8,51	8,84	8,60	9,04
	24	1	8,78	8,93	9,00	9,15	9,38
		2	8,48	8,57	8,89	9,00	9,26
	48	1	6,71	6,86	8,79	9,11	9,28
		2	8,81	9,00	8,91	8,99	9,26

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.12

Testkeim und Stammbezeichnung: Klebsiella			$\log_{10}$				
K8, RKI			Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstums- phase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatel- verfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag- Phase	0	1	4,20	4,20	4,76	4,79	5,08
		2	3,93	3,86	4,86	5,08	5,28
	2	1	4,80	4,82	5,46	5,36	5,72
		2	5,56	5,43	5,32	5,53	5,74
	4	1	6,75	6,36	6,45	6,65	6,86
		2	6,88	6,81	6,49	6,86	7,00
	6	1	8,08	8,00	7,66	7,85	8,08
		2	7,97	7,89	7,92	7,63	8,11
	16	1	8,81	8,56	8,96	8,49	9,08
		2	8,85	8,76	8,97	8,66	9,15
logarithmische Vermehrungsphase	18	1	8,77	8,56	8,90	8,54	9,04
		2	8,89	8,86	8,88	8,54	9,04
	20	1	8,79	8,76	8,84	8,43	8,98
		2	9,00	8,85	8,94	8,18	9,00
	24	1	8,84	8,83	8,86	8,59	9,04
		2	8,86	8,83	9,00	8,63	9,15
	48	1	8,73	8,75	8,95	8,62	9,11
		2	8,92	8,91	9,00	8,74	9,20
	72	1	8,70	8,57	8,94	8,61	9,11
		2	8,65	8,58	9,00	8,65	9,18
stationäre bzw. Absterbephase							

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.13

Testkeim und Stammbezeichnung:			log ₁₀				
Enterobacter aerogenes E36, BGA			Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Wachstumsphase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spatelverfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag-Phase	0	1	4,30	4,28	4,86	5,11	5,30
		2	5,81	5,18	4,79	6,04	6,08
	2	1	5,15	5,30	5,26	5,61	5,77
		2	6,36	6,49	5,95	6,61	6,70
	4	1	6,69	6,70	6,18	6,85	6,93
		2	8,62	8,11	8,26	8,00	8,45
	6	1	7,75	7,90	7,60	7,90	8,08
		2	8,71	8,34	8,15	8,52	8,67
	16	1	8,51	8,57	7,90	8,23	8,40
		2	8,72	8,38	8,42	8,81	8,96
logarithmische Vermehrungsphase	18	1	8,62	8,56	8,67	8,36	8,85
		2	8,78	8,57	8,69	8,81	9,04
	20	1	8,67	8,57	8,75	8,38	8,90
		2	8,66	8,58	8,23	9,00	9,08
	24	1	8,72	8,79	8,82	8,52	9,00
		2	8,60	8,20	8,76	9,04	9,23
	48	1	6,79	6,79	8,40	8,75	8,91
		2	7,54	7,28	8,57	8,92	9,08
stationäre bzw. Absterbephase							

ETS + : Elektronenttransportssystem - positiv

ETS - : Elektronenttransportssystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.14

Testkeim und Stammbezeichnung:		$\log_{10}$					
		Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)			
Escherichia coli ATCC 25922							
Wachstums- phase	Alter (h)	Test	Drop plating	Spätel- verfahren	Epifluoreszenz		
					ETS +	ETS -	Σ
lag- Phase	0	1	5,04	4,94	4,99	5,41	5,56
		2	4,86	4,56	4,89	5,15	5,34
	2	1	5,46	5,34	5,60	5,70	5,95
		2	5,51	5,41	5,52	5,60	5,86
logarithmische Vermehrungsphase	4	1	7,20	7,11	7,18	6,62	7,28
		2	7,18	6,95	7,26	6,90	7,41
	6	1	8,32	8,26	8,15	7,89	8,34
		2	8,43	8,46	8,36	7,89	8,49
	16	1	8,57	8,49	8,45	8,56	8,81
		2	8,93	8,77	8,71	8,59	8,95
	18	1	8,32	8,45	8,81	8,34	8,94
		2	8,86	8,86	8,84	8,57	9,04
stationäre bzw. Absterbephase	20	1	8,57	8,45	8,77	8,28	8,89
		2	8,89	8,81	8,83	8,38	8,96
	24	1	8,56	8,60	8,75	8,32	8,89
		2	8,89	8,84	8,72	8,65	8,99
	48	1	7,36	7,30	8,49	8,53	8,81
		2	8,83	8,62	8,99	8,72	9,18

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.18-20:

Kulturell (Cfu) und mikroskopisch erzielte Einzelbefunde
bei Abtrageproben von Fleischoberflächen, geordnet nach
steigender Cfu-Zahl pro ml unfiltriertes Homogenisat

Tab.18

Abtrage- proben	log ₁₀				
	Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
	Drop plating		Epifluoreszenz		
Lfd.Nr.	unfiltriert	filtriert	ETS +	ETS -	Σ
1	3,00	3,89	5,86	6,11	6,30
2	3,00	3,30	6,18	5,86	6,34
3	3,74	3,66	5,42	5,20	5,62
4	4,26	4,18	5,94	6,00	6,28
5	4,38	4,11	6,08	6,28	6,48
6	4,87	3,81	5,57	5,66	5,91
7	4,93	4,40	5,56	5,49	5,83
8	5,42	6,28	6,26	5,83	6,40
9	5,96	5,42	5,61	6,00	6,15
10	5,97	5,34	6,00	5,89	6,26
11	6,11	7,70	7,64	8,15	8,26
12	6,18	6,15	6,28	6,04	6,48
13	6,34	4,72	5,72	5,86	6,08
14	6,36	5,51	6,56	6,72	6,94
15	6,42	5,34	5,61	5,76	5,99
16	6,48	6,00	6,18	6,08	6,43
17	6,48	6,86	6,62	6,28	6,79
18	6,49	5,96	6,08	5,89	6,30
19	6,49	6,26	6,23	5,83	6,38
20	6,65	5,68	6,56	6,32	6,76
21	6,66	6,79	6,86	6,63	7,08
22	6,66	6,40	6,28	6,11	6,51
23	6,82	6,51	6,43	6,23	6,64
24	7,08	6,66	6,48	6,15	6,64
25	7,08	4,91	6,42	6,49	6,76
26	7,15	8,15	7,78	8,26	8,38
27	7,23	7,83	7,79	7,86	8,11
28	7,28	5,90	6,72	6,49	6,92
29	7,30	6,94	6,99	6,83	7,23

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.19

Abtrage- proben	log ₁₀				
	Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
	Drop plating		Epifluoreszenz		
Lfd.Nr.	unfiltriert	filtriert	ETS +	ETS -	Σ
30	7,32	6,90	7,00	6,82	7,23
31	7,38	7,93	7,66	7,79	8,04
32	7,38	5,95	6,72	6,72	7,00
33	7,40	6,58	6,70	6,32	6,85
34	7,40	7,23	7,36	7,26	7,61
35	7,43	7,26	7,65	7,49	7,88
36	7,45	7,36	6,99	6,88	7,23
37	7,51	7,26	6,97	6,99	7,28
38	7,64	7,45	6,85	7,32	7,45
39	7,75	7,74	7,78	7,74	8,08
40	7,81	7,91	7,88	7,85	8,18
41	7,81	7,49	7,76	7,64	8,00
42	7,83	7,15	7,45	7,08	7,60
43	7,85	7,75	7,70	7,81	8,08
44	7,88	7,83	7,51	7,88	8,04
45	7,95	7,97	8,11	7,72	8,26
46	7,96	8,18	8,11	7,52	8,20
47	7,98	8,04	7,84	7,61	8,04
48	8,15	6,18	6,66	6,94	7,11
49	8,15	7,26	7,82	7,66	8,04
50	8,18	7,68	8,11	7,93	8,34
51	8,26	8,18	8,15	7,93	8,36
52	8,32	8,85	8,23	7,99	8,43
53	8,38	6,52	6,86	7,18	7,34
54	8,43	8,26	8,49	8,18	8,66
55	8,48	8,54	7,99	8,26	8,45
56	8,48	7,36	8,40	8,15	8,59
57	8,52	8,32	8,57	8,49	8,83
58	8,53	8,23	7,88	8,38	8,51

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.20

Abtrage- proben	$\log_{10}$				
	Cfu /ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
	Drop plating		Epifluoreszenz		
Lfd.Nr.	unfiltriert	filtriert	ETS +	ETS -	Σ
59	8,54	7,86	8,08	8,60	8,72
60	8,54	8,88	8,91	8,53	9,08
61	8,54	8,36	8,04	7,97	8,30
62	8,56	8,38	8,40	8,18	8,60
63	8,59	8,93	8,26	8,18	8,52
64	8,65	8,51	8,85	8,72	9,08
65	8,67	8,36	8,11	8,18	8,45
66	8,70	7,85	8,85	8,64	9,04
67	8,72	8,57	8,85	8,66	9,08
68	8,76	8,61	9,23	9,00	9,43
69	8,79	8,45	7,96	8,77	8,83
70	8,89	8,91	9,30	9,43	9,67
71	8,89	8,61	9,26	9,08	9,48
72	8,94	7,91	8,15	8,63	8,76
73	8,99	9,15	9,00	8,85	9,23
74	9,08	9,42	8,85	8,91	9,18
75	9,11	9,59	8,98	8,98	9,28
76	9,11	7,86	8,75	8,59	8,98
77	9,14	9,61	9,43	9,26	9,65
78	9,15	8,36	9,23	9,08	9,46
79	9,20	9,26	8,94	9,08	9,32
80	9,23	9,36	9,18	9,11	9,45
81	9,26	9,32	9,26	9,53	9,72
82	9,32	9,08	9,15	8,70	9,28
83	9,34	9,04	9,08	8,96	9,32
84	9,46	9,30	9,11	8,99	9,36
85	9,53	9,48	9,51	9,53	9,82
86	9,56	9,43	9,20	9,32	9,57

ETS + : Elektronentransportssystem - positiv

ETS - : Elektronentransportssystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.21-24:

Kulturell (Cfu) und mikroskopisch erzielte Einzelbefunde bei Abspülproben von Fleischoberflächen, geordnet nach steigender Cfu-Zahl pro ml unfiltrierte Spülflüssigkeit

Tab.21

Abspül- proben	log ₁₀				
	Cfu /ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
	Drop plating		Epifluoreszenz		
Lfd.Nr.	unfiltriert	filtriert	ETS +	ETS -	Σ
1	3,23	3,92	5,92	5,89	6,20
2	3,80	4,96	6,52	6,26	6,71
3	4,42	3,48	5,83	5,94	6,20
4	4,46	4,45	6,79	6,00	6,85
5	4,48	4,20	5,97	6,08	6,32
6	4,88	4,04	5,53	5,49	5,81
7	5,08	4,51	5,57	5,48	5,83
8	5,08	4,61	5,04	4,72	5,20
9	5,11	4,28	5,40	5,52	5,76
10	5,20	4,60	5,34	4,89	5,48
11	5,28	4,86	4,94	4,76	5,18
12	5,43	4,38	5,08	4,72	5,23
13	5,48	4,79	5,49	5,92	6,04
14	5,60	5,23	5,42	5,83	5,97
15	5,83	5,32	5,76	5,85	6,11
16	6,08	6,46	5,83	6,00	6,23
17	6,08	5,20	5,79	5,94	6,18
18	6,08	5,43	6,42	6,49	6,76
19	6,18	6,38	6,18	5,61	6,28
20	6,36	7,58	7,69	7,34	7,85
21	6,40	6,61	7,08	6,56	7,20
22	6,43	7,11	7,04	6,64	7,18
23	6,46	6,67	6,83	6,61	7,04
24	6,46	7,23	7,42	6,94	7,54
25	6,52	6,30	6,15	6,34	6,56
26	6,62	6,18	6,43	6,30	6,67
27	6,78	7,67	7,72	7,46	7,91
28	6,81	7,34	7,11	7,00	7,36

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.22

Abspül- proben	log ₁₀				
	Cfu /ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Lfd.Nr.	Drop plating		Epifluoreszenz		
	unfiltriert	filtriert	ETS +	ETS -	Σ
29	6,83	6,11	7,26	7,00	7,45
30	6,83	6,73	6,81	6,36	6,94
31	6,91	6,23	5,93	5,93	6,23
32	6,92	6,08	5,83	5,54	6,00
33	6,93	6,64	6,87	7,00	7,26
34	7,00	6,85	6,75	6,57	6,97
35	7,11	5,79	6,38	6,11	6,57
36	7,15	7,30	7,34	6,98	7,51
37	7,15	7,20	7,08	7,11	7,40
38	7,18	6,51	6,36	6,11	6,56
39	7,20	7,28	6,93	7,00	7,28
40	7,23	6,90	7,00	6,61	7,15
41	7,23	7,49	7,38	7,36	7,67
42	7,30	7,34	7,04	7,23	7,45
43	7,32	7,56	7,54	7,43	7,79
44	7,34	7,18	6,86	7,11	7,30
45	7,38	6,81	6,04	6,04	6,34
46	7,38	7,94	8,00	7,86	8,26
47	7,52	8,18	7,84	7,77	8,11
48	7,54	7,72	8,08	7,86	8,28
49	7,56	7,46	7,60	7,54	7,88
50	7,57	7,08	7,23	7,23	7,53
51	7,65	8,00	7,84	7,46	7,99
52	7,66	7,71	7,48	7,43	7,76
53	7,72	7,49	7,65	7,68	7,97
54	7,73	8,18	7,65	7,72	7,99
55	7,90	7,92	7,83	7,76	8,08
56	7,97	8,23	7,88	8,00	8,26

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.23

Abspül- proben	log ₁₀				
	Cfu/ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
	Drop plating		Epifluoreszenz		
Lfd.Nr.	unfiltriert	filtriert	ETS +	ETS -	Σ
57	7,98	7,83	7,92	7,46	8,04
58	7,99	7,70	7,63	7,66	7,95
59	8,00	8,98	8,83	8,71	9,15
60	8,04	8,11	8,18	8,00	8,40
61	8,08	7,74	7,61	7,43	7,83
62	8,08	7,57	7,57	7,62	7,99
63	8,11	8,00	7,71	8,32	8,42
64	8,15	7,67	7,23	7,69	7,82
65	8,15	7,62	7,70	7,68	7,99
66	8,15	7,92	8,00	7,58	8,15
67	8,18	8,18	8,04	7,95	8,30
68	8,18	8,18	8,08	8,18	8,43
69	8,20	7,83	8,04	8,18	8,42
70	8,26	8,18	8,32	8,04	8,52
71	8,26	8,48	8,34	8,60	8,79
72	8,28	7,86	7,92	7,91	8,23
73	8,28	7,28	7,92	7,39	8,20
74	8,30	8,23	8,30	8,11	8,52
75	8,32	8,04	8,20	8,08	8,45
76	8,34	8,26	8,00	7,97	8,28
77	8,43	8,67	8,52	8,49	8,81
78	8,46	8,62	8,52	8,54	8,83
79	8,51	8,11	8,08	8,20	8,45
80	8,51	8,30	7,97	8,18	8,38
81	8,52	8,15	8,23	8,34	8,59
82	8,57	8,79	8,45	8,04	8,59
83	8,59	8,98	8,96	8,48	9,08
84	8,61	9,08	8,54	8,96	9,11

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Tab.24

Abspül- proben	$\log_{10}$				
	Cfu /ml		Keimzahl/ml (mikroskopisch)		
Lfd.Nr.	Drop plating		Epifluoreszenz		
	unfiltriert	filtriert	ETS +	ETS -	Σ
85	8,64	8,36	8,48	8,08	8,62
86	8,66	8,23	8,00	7,98	8,30
87	8,71	8,38	8,43	8,42	8,72
88	8,73	8,49	8,34	7,92	8,48
89	8,74	8,99	8,63	8,79	9,04
90	8,81	9,20	9,04	8,61	9,18
91	9,36	8,68	9,49	9,56	9,83

ETS + : Elektronentransportsystem - positiv

ETS - : Elektronentransportsystem - negativ

Cfu : Colony forming units

Abb. 5:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl CfU(Spätel-Verfahren) bei 2 Stämmen der Moraxella-Acinetobacter-Gruppe

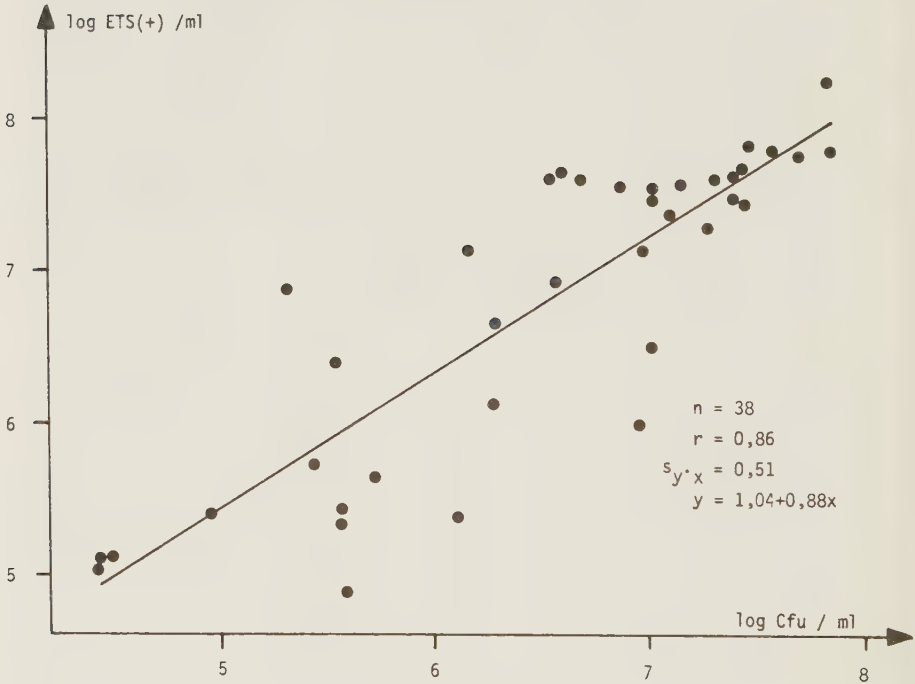


Abb. 5a:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl CfU (Drop plating-Verfahren) bei 2 Stämmen der Moraxella-Acinetobacter-Gruppe

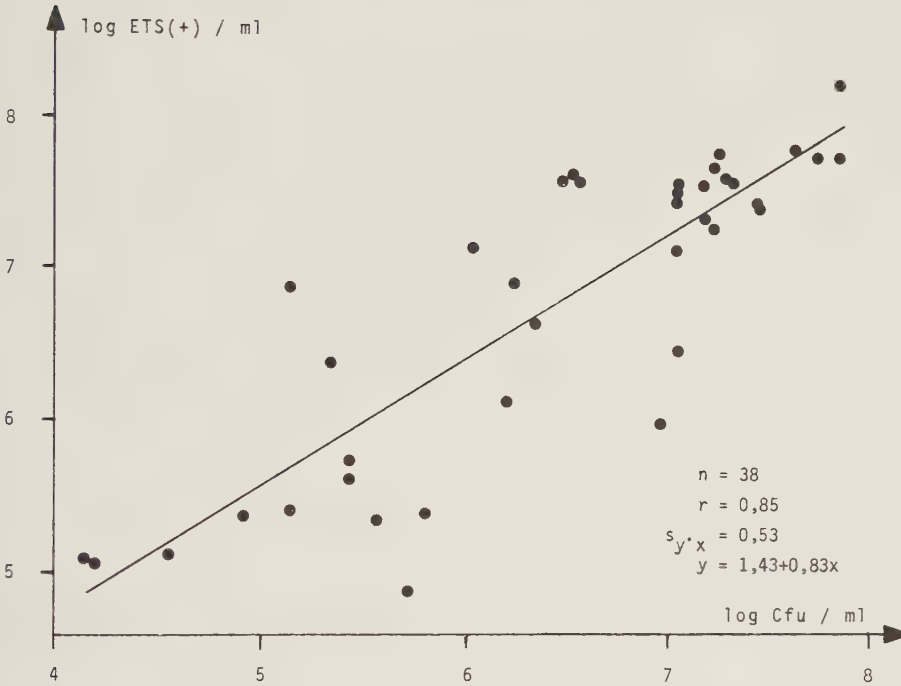


Abb. 6:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl CfU (Spatel-Verfahren) bei einem *L. plantarum*- und einem *Sc. faecalis*-Stamm

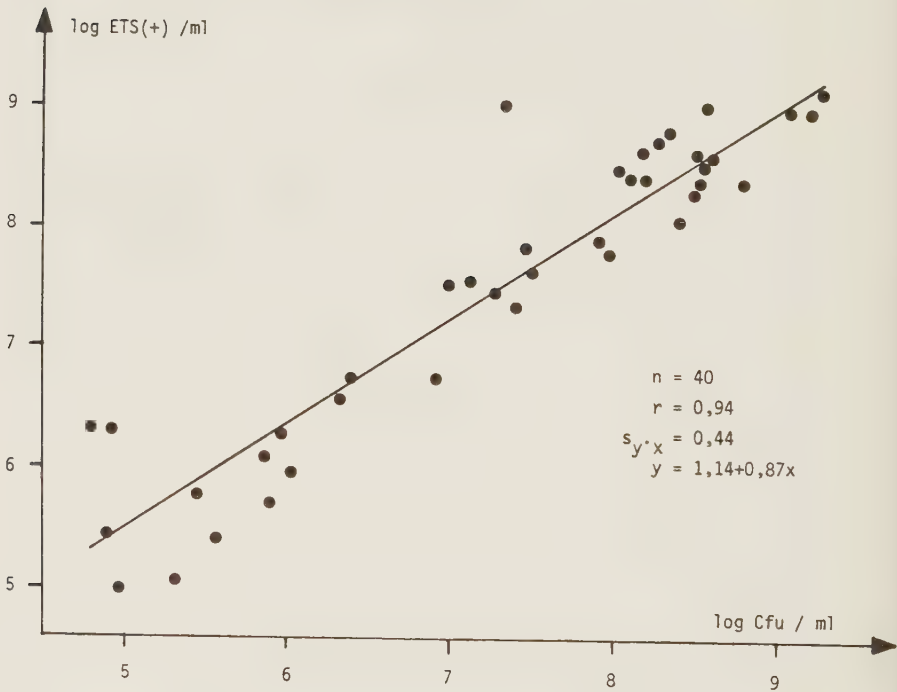


Abb. 6a:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl Cf_u (Drop plating-Verfahren) bei einem *L. plantarum*- und einem *Sc. faecalis*-Stamm

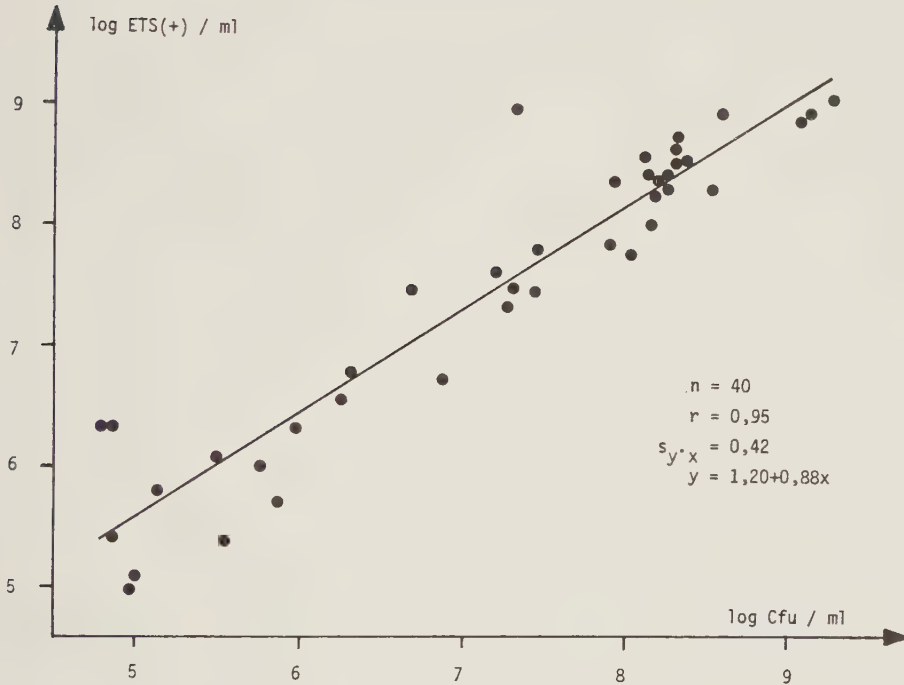


Abb. 7:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl CfU (Spatel-Verfahren) bei 3 *Pseudomonas*-Stämmen

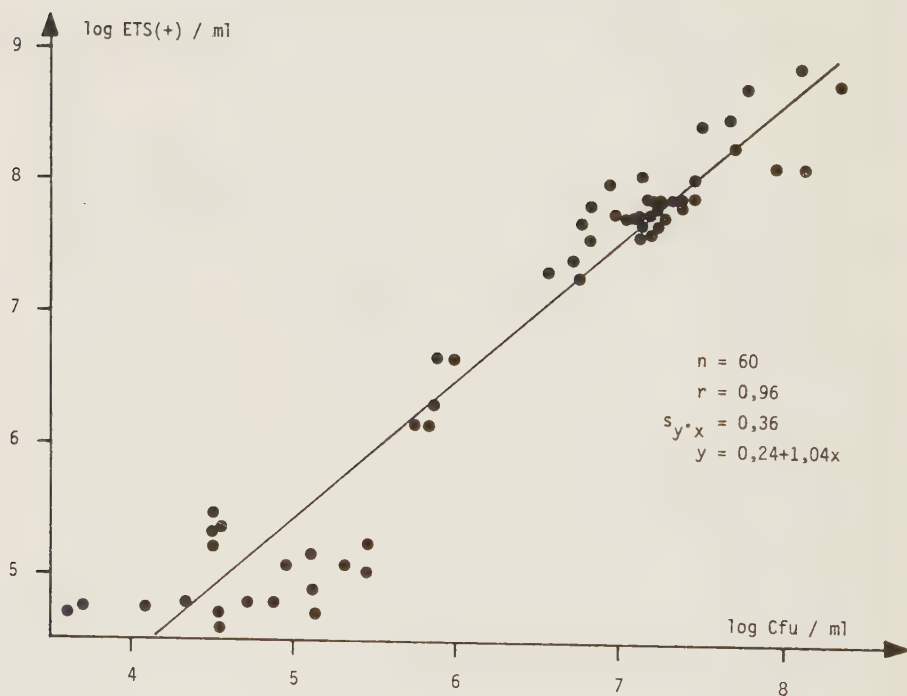


Abb. 7a:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl CfU (Drop plating-Verfahren) bei 3 *Pseudomonas*-Stämmen

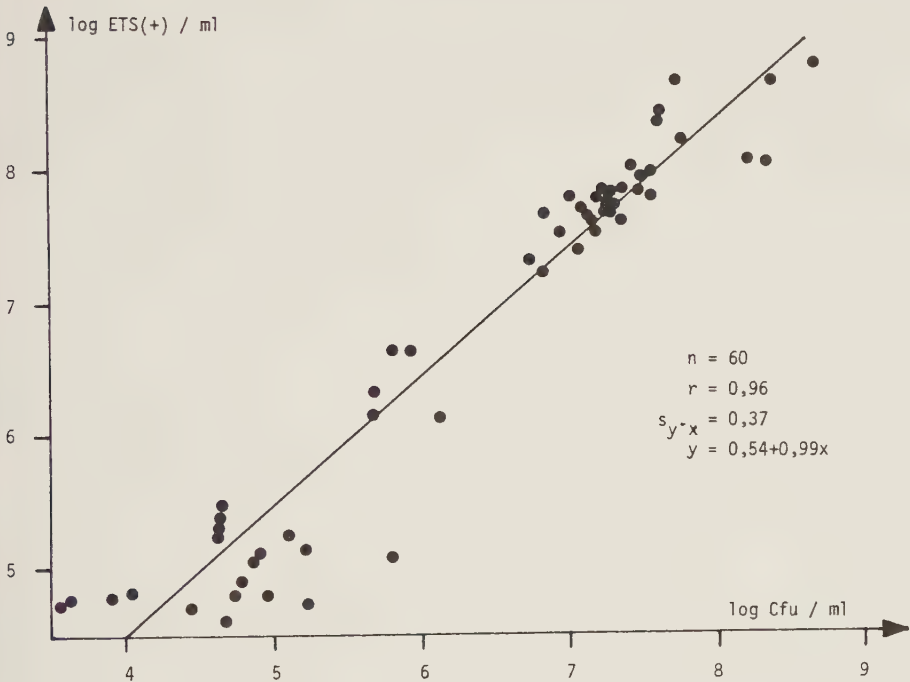


Abb. 8: Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl Cf_u (Spätel-Verfahren) bei einem *Mc. luteus*- und einem *St. aureus*-Stamm

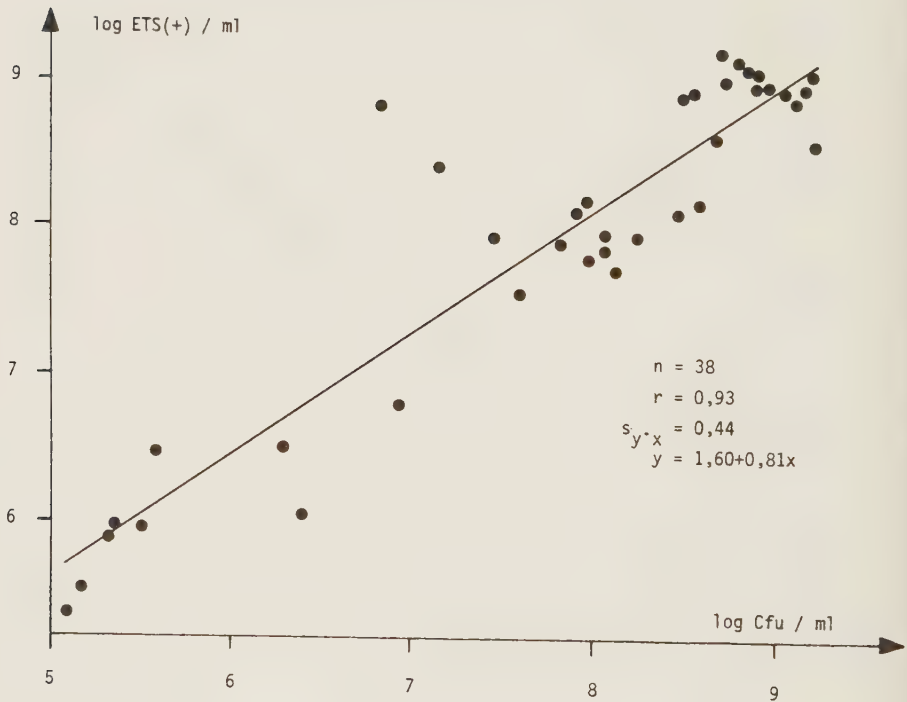


Abb. 8a:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl Cf_u (Drop plating-Verfahren) bei einem *Mc. luteus*- und einem *St. aureus*-Stamm

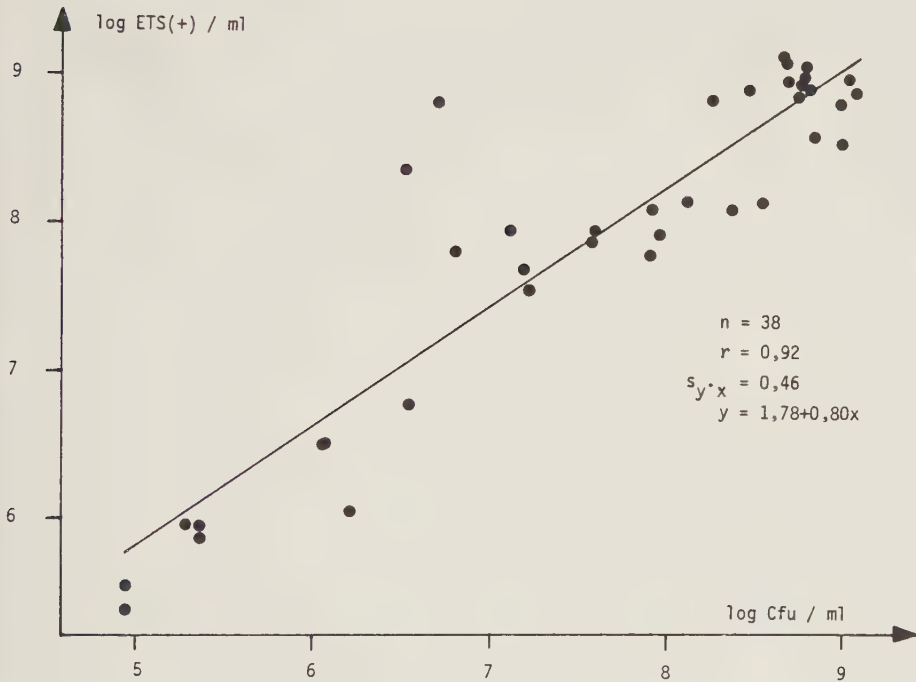


Abb. 9: Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl CfU (Spatel-Verfahren) bei 3 Stämmen der Enterobacteriaceae

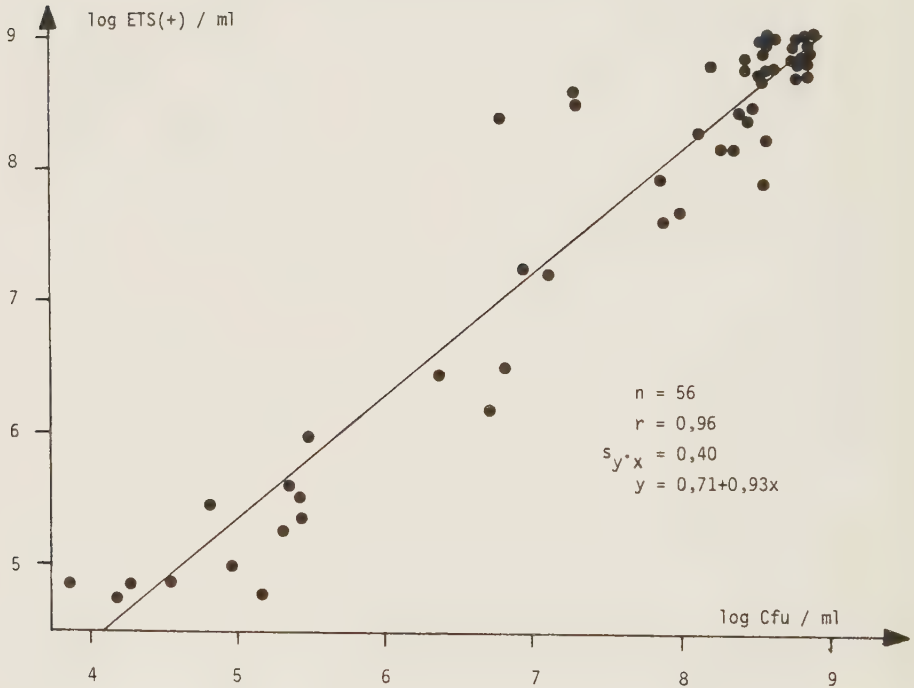
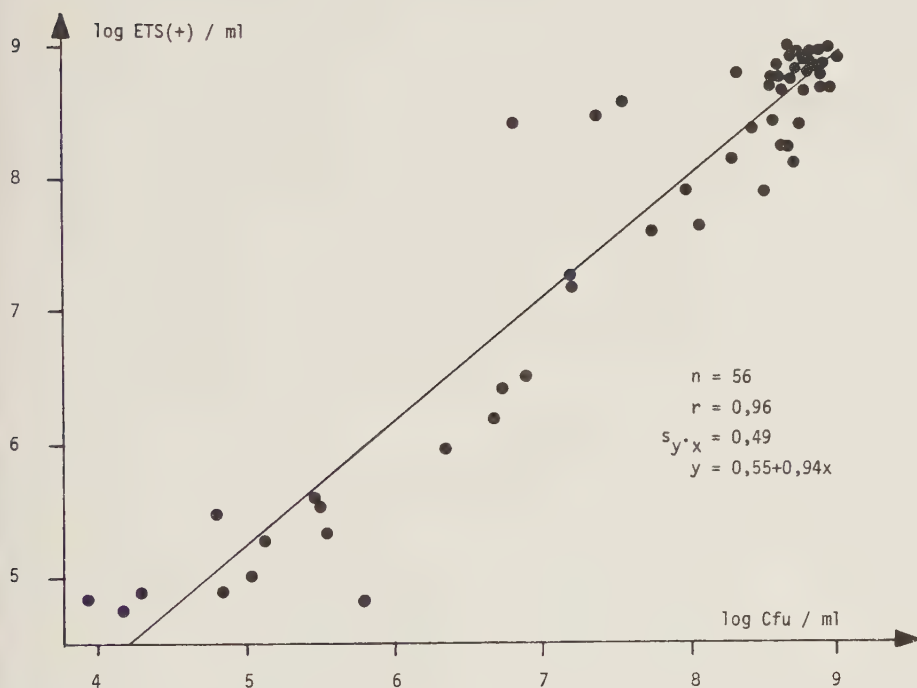


Abb. 9a:

Beziehung zwischen ETS(+)-Zellen und kultureller Keimzahl Cf_u (Drop plating-Verfahren) bei 3 Stämmen der Enterobacteriaceae



X. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

Attwell, R.W. u. R.R. Colwell

Use of epifluorescence microscopy in studies
of the germination and recovery of Thermo-
actinomycetes

Appl. Microbiol. 43, 478-482 (1982)

Barrel, R.A.E. u. A.M. Paton

A semi-automatic method for the detection of
salmonellas in food products

J. appl. Bact. 46, 153-159 (1979)

Bashan, Y., Kritzmman, G., Sharon, E., Okon, Y. u. Y. Henis

A note on the detection of phytopathogenic
bacteria within the leaf by a differential
staining procedure

J. appl. Bact. 50, 315-317 (1981)

Baumgart, J. u. H. Kußmann

Eine Sprühmethode zur Ermittlung des Oberflä-
chenkeimgehaltes bei Schlachttieren

Fleischwirtschaft 55, 1113-1114 (1975)

Baumgart, J., Schierholz, B. u. C. Huy

Membranfilter-Mikrokolonie-Fluoreszenz-Methode
(MMCF-Methode) zum Schnellnachweis des Oberflä-
chenkeimgehaltes von Frischfleisch

Fleischwirtschaft 61, 726-730 (1981)

Becker-Birk, J.

Bakterienzahl und bakterielle Aktivität in
Gewässern unterschiedlicher Abwasserbelastung
Math.Nat. Diss. Christian-Albrechts-Univ.
Kiel, 1978

dies. Bakterienzahl und bakterielle Aktivität in Wasser-
körpern unterschiedlicher Belastung
Zbl. Bakt., I. Orig. C1, 281-292 (1980)

Bem, Z., Leistner, L. u. J. Dresel

Schnellmethoden zur Keimzahlbestimmung bei Fleisch
Fleischwirtschaft 56, 1803-1804 (1976)

Bitton, G. u. B. Koopman

Tetrazolium reduction-malachite green method for
assessing the viability of filamentous bacteria
in activated sludge
Appl. Microbiol. 43, 964-966 (1982)

Bowden, W. B.

Comparison of two direct-count techniques for
enumerating aquatic bacteria
Appl. Microbiol. 33, 1229-1232 (1977)

Bucherer, H.

Zur Frage der Differentialfärbung lebender und
toter Mikroorganismen mit Acridinorange nach
Strugger
Z. Biol. 115, 175-184 (1965-67)

Bülte, M.

Persönliche Mitteilung (1981)

Clark,G.

Staining procedures

The Williams & Wilkins Co.,Baltimore

3rd edition,1973, S.304-307

Clark,R.T.J. u. G.E.Naylor

Fluorescence microscopy of gut microbes

in: Microbial ecology

Ed. Loutit,M.W. u. J.A.R.Miles

Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York

1978, S.244-245

Christensen,J.P., Owens,T.G., Devol,A.H. u. T.T.Packard

Respiration and physiological state in

marine bacteria

Mar. Biol. 55, 267-276 (1980)

Coleman,A.W.

Enhanced detection of bacteria in natural

environments by fluorochrome staining of DNA

Limnol. Oceanogr. 25, 948-951 (1980)

Dahle,A.B. u. M.Laake

Diversity dynamics of marine bacteria

studied by immunfluorescent staining on

membrane filters

Appl. Microbiol. 43, 169-176 (1982)

Drier,T.M. u. E.L.Thurston

Preparation of aquatic bacteria for enumeration

by scanning electron microscopy

Scanning Electron Microscopy 11, 843-848 (1978)

Entis,P., Brodsky,M.H., Sharpe,A.N. u. G.A.Jarvis

Rapid detection of salmonella ssp. in food
by use of the Iso-Grid hydrophobic grid
membrane filter

Appl. Microbiol. 43, 261-268 (1982)

Fahlberg, W.J.

A comprehensive hospital environmental
monitoring program

Hlth. Lab. Sci. 11, 76-79 (1974)

Fieser,L. u. M.Fieser

Organische Chemie

Verlag Chemie, Weinheim-New York

2. Auflage 1968, S.1329-1333

Francisco,D.E., Mah,R.A. u. A.C.Rabin

Acridin orange-epifluorescence technique for
counting bacteria in natural waters

Trans. Amer. Micros. Soc. 92, 416-421 (1973)

Gill,C.O. u. N.Penney

Penetration of bacteria into meat

Appl. Microbiol. 33, 1284-1286 (1977)

Graham,R.K. u. P.Caiger

Fluorescence staining for the determination
of cell viability

Appl. Microbiol. 17, 489-490 (1969)

Guthrie, R.K. u. D.J. Reeder

Membrane filter-fluorescent-antibody method
for detection and enumerating of bacteria
in water

Appl. Microbiol. 17, 399-401 (1969)

Hallmann, L.

Klinische Chemie und Mikroskopie

Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York

11. Aufl. 1980, S.49

Hammes, H.

Anwendung von Fluorochromen für den diagno-
stischen Nachweis von Bakterien einschließlich
Rickettsien, Chlamydien und Mycoplasmen
Vet. med. Diss. Gießen, 1979

Harvey, R.W. u. L.Y. Young

Enumeration of particle-bound and unattached
respiring bacteria in the salt marsh environment
Appl. Microbiol. 40, 156-160 (1980)

Hobbie, J.E., Daley, R.J. u. S. Jasper

Use of Nuclepore filters for counting bacteria
by fluorescence microscopy
Appl. Microbiol. 33, 1225-1228 (1977)

Hossell, J.C. u. J.H. Baker

A note on the enumeration of epiphytic bacteria
by microscopic methods with particular reference
to two freshwater plants
J. Bact. 46, 87-92 (1979)

Jones, J.G. u. B.M. Simon

An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with a reference to a new method for dying membrane filters

J. Bact. 39, 317-329 (1975)

Kayser, F.H. u. J. Kolar

Ergebnisse der praktischen Bewertung des Auto Microbic System (AMS-120TM)

Zbl. Bakt. I. Orig. A, 245, 222-228 (1979)

Koch, K.

Untersuchungen über einen fluoreszenzserologischen Nachweis von Clostridiensporen als Mikrokulturen auf Membranfiltern

Vet. med. Diss. Gießen, 1975

Korgaonkar, K.S. u. S.S. Ranade

Evaluation of acridine orange fluorescence test in viability studies on Escherichia coli
Can. J. Microbiol. 12, 185-190 (1966)

Kraft, W.

The technology of new fluorescence illumination systems

in: Mikroskopie 31, Heft 516, 129-146 (1975)

ders.

Der Objektbedeckungsgrad als Korrekturmittel zur Erzielung optimaler Belichtungswerte in der Mikrophotographie

in: Mikroskopie-Elektronenmikroskopie Suppl. 12-15 (1981)

Leistner, L., Bem, Z. u. J. Dresel

Schnellmethoden zur Keimzahlbestimmung bei
Fleisch

Mitteilungsbl. der Bundesanstalt für Fleisch-
forschung, Kulmbach, Nr. 56, 3070-3072 (1977)

Leistner, L.

Ursachen des mikrobiellen Verderbs
Fleischerei 34, 364-370 (1981)

Leistner, L., Bem, Z., Dresel, J. u. S. Promeuschel

Mikrobiologische Standards für Fleisch, S. 153
Abschlußbericht Juni 1981

für das vom Bundesminister für Jugend, Familie
und Gesundheit unterstützte Forschungsvorhaben:
Mikrobiologische Standards für rohes Fleisch
unter Berücksichtigung von Wildfleisch

Institut für Mikrobiologie, Toxikologie und
Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung,
Kulmbach

Loy, S. u. G. Rheinheimer

Mikrobiologische Untersuchungen in Flüssen
III. Anzahl und Biomasse der aktiven Bakterien
in einigen norddeutschen Flüssen
Arch. Hydrobiol. 88, 439-449 (1980)

Macheod, R.A., Smith, L.D.H. u. R. Gelinas

Metabolic injury to bacteria

I. Effect of freezing and storage on the requirements of *Aerobacter aerogenes* and *Escherichia coli* for growth

Can. J. Microbiol. 12, 61-72 (1966)

Maki, J.S. u. C.C. Remsen

Comparison of two direct-count methods for determining metabolizing bacteria in freshwater

Appl. Microbiol. 41, 1132-1138 (1981)

Marx, M.

Untersuchungen zur Mikrobiocoenose von Lebensmittelmikroorganismen

Vet. med. Diss. FU Berlin, 1972

McKinnon, C.H. u. R. Mansell

Rapid counting of bacteria in rinses of milking equipment by a membrane filtration-epifluorescent microscopy technique

J. appl. Bact. 51, 363-367 (1981)

Neumayr, L.

Bedeutung der Keimzahl

Vortrag anlässlich der Kulmbacher Fortbildungstage am 13.10.1980

Fleischerei 32, 156-159 (1981)

Paton, A.M. u. S.M. Jones

The observation of micro-organisms by incident
fluorescence microscopy

J. appl. Bact. 36, 441-443 (1973)

Paul, J.H.

Use of Hoechst dyes 33258 and 33342 for
enumeration of attached and planktonic bacteria
Appl. Microbiol. 43, 939-944 (1982)

Peterkin, P.J., Sharpe, A.N. u. D.W. Warburton

Inexpensive treatment of frozen dairy products
for membrane filtration

Appl. Microbiol. 43, 486-487 (1982)

Pettipher, G.L., Mansell, R., McKinnon, C.H. u. C.M. Cousins

Rapid membrane filtration-epifluorescent
microscopy technique for direct enumeration of
bacteria in raw milk

Appl. Microbiol. 39, 423-429 (1980)

Pettipher, G.L. u. U.M. Rodrigues

Rapid enumeration of bacteria in heat-treated
milk and milk products using a membrane
filtration-epifluorescent microscopy technique
J. appl. Bact. 50, 157-166 (1981)

dies.

Rapid enumeration of microorganisms in foods
by the direct epifluorescent filter technique
Appl. Microbiol. 44, 809-813 (1982)

Ramsey,W.S., Nowland,E.D., Simpson,L.B., Messing,R.A.
u. M.M.Takeguchi

Applications of fluorophore-containing
microbial growth media

Appl. Microbiol. 39, 372-375 (1980)

Repentigny,J.de, Sonea,S. u. A.Frappier

Acridin orange fluorochroming and ultraviolet
absorption of Staphylococcus aureus cells
modified by unbalanced nucleid acid and cell
wall synthesis

Can. J. Microbiol. 12, 677-682 (1966)

Reuter,G.

Mikrobiologische Analyse von Lebensmitteln
mit selektiven Medien

Arch. Lebensmittelhyg. 21, 30-35 (1970)

ders. Untersuchungen zur antagonistischen Wirkung
der Milchsäurebakterien auf andere Keim-
gruppen der Lebensmittelflora

Zbl. Vet. Med. B, 19, 320-334 (1972)

Reuter,G., Sasse,D. u. G.Sibomana

Entwicklung und Prüfung eines Abspülgerätes
zur Erfassung des Oberflächenkeimgehaltes an
Schlachttierkörpern

Arch. Lebensmittelhyg. 30, 126-129 (1979)

Rosendal, S. u. A. Valdivieso-Garcia

Enumeration of mycoplasmas after acridin
orange staining

Appl. Microbiol. 41, 1000-1002 (1981)

Sachs, L.

Angewandte Statistik

Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York

5. Auflage, 1979, S. 142 ff

Scholefield, J.

The direct staining of micro-organisms by
selected fluorochromes
in: 2nd international Symposium on rapid methods
and automation in microbiology

Ed. Johnston, H. H. u. S. W. B. Newsom

Oxford-New York, 1976, S. 253-260

Sharpe, A. N. u. G. L. Michaud

Enumerating of bacteria using hydrophobic
grid membrane filters

Appl. Microbiol. 28, 223-225 (1974)

Sharpe, A. N., Peterkin, P. J. u. J. Dudas

Membrane filtration of food suspensions

Appl. Microbiol. 37, 21-35 (1979)

Speth, J. L. u. C. H. Nash

Fluorescent staining technique for nucleoid
regions of *Streptosporangium albidum* and
Streptosporangium brasiliense

Appl. Microbiol. 39, 1042-1045 (1980)

Strasser,L.

Prüfung ausgewählter Schnellverfahren zur
Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes von
Rinderschlachttierkörpern und Wild (Reh und
Hirsch)-zugleich Angaben über die Höhe und
die Zusammensetzung dieser Mikroflora
Vet. med. Diss. FU Berlin, 1979

Strugger,S.

Neues über die Fluoreszenzfärbung toter und
lebender Bakterien
1.Zur Theorie der Bakterienfärbung
2.Ein neues Verfahren zur mikroskopischen
Unterscheidung lebender und toter Bakterien-
zellen
Dtsch. tierärztl. Wschr. 50, 51-53 (1942)

ders. in: Hallmann,L.

Bakteriologie und Serologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3.Auflage,
1961, S.876

Thomason,B.M.

Rapid detection of salmonella microcolonies
by fluorescent antibody
Appl. Microbiol. 22, 1064-1069 (1971)

Thomason,B.M., Hebert,G.A. u. W.B.Cherry

Evaluation of a semiautomated system for
direct fluorescent antibody detection of
salmonellae

Appl. Microbiol. 30, 557-564 (1975)

Walter,F.

Über die Fluoreszenzmikroskopie mit markierten
Proteinen

Leitz-Mitteilungen Wiss.und Technik,Bd.II,

Nr.7, 207-215 (1964) Wetzlar

ders. Eine Auflichtfluoreszenzeinrichtung für die
Routinediagnostik

Leitz-Mitteilungen Wiss.und Technik,Bd.IV,

Nr.6, 186-187 (1968) Wetzlar

Wick,G., Baudner,S. u. F.Herzog

Immunfluoreszenz

Medizinische Verlagsgesellschaft

Marburg/Lahn, 1976

Winter,F.H., York,G.K. u. H.El-Nakhal

Quick counting method for estimating the
number of viable microbes on food and food
processing equipment

Appl. Microbiol. 22, 89-92 (1971)

Wohlfeil, T.

Zur Kritik einiger Methoden der Bakterien-
zählung

Vergleichende Untersuchungen zwischen der
mikroskopischen Auszählung im Dunkelfeld, dem
Plattengußverfahren und der Trockensubstanz-
bestimmung

Zbl. Bact. I, Orig., 127, 492-509 (1933)

Wood, J.M.

The interaction of micro-organisms with
ion exchange resins

in: Microbial adhesions to surfaces

Ed. Berkeley, Lynch, Melling, Rutter, Vincent
1981

Yourassowsky, E. u. E. Schoutens

Automated counting of colonies by micro-
videomat, pp. 81-85

in: Automation in microbiology and immunology

Ed. Hedén, C.G. u. T. Illéni

Verl.: John Wiley & Sons

New York - London, 1975

Zierdt, C.H.

Adherence of bacteria, yeast, blood cells,
and latex spheres to large-porosity membrane
filters

Appl. Microbiol. 38, 1166-1172 (1979)

Zimmermann,R. u. L.-A.Meyer-Reil

A new method for fluorescence staining of
bacterial populations on membrane filters
Kieler Meeresforsch. 30, 24-27 (1974)

Zimmermann,R., Iturriaga,R. u. J.Becker-Birk

Simultaneous determination of the total
number of aquatic bacteria and the number
thereof involved in respiration
Appl. Microbiol. 36, 926-935 (1978)

Herrn Prof. Dr. G. Reuter möchte ich für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit herzlich danken.

Danken möchte ich ebenso Frau Dr. G. Arndt und Herrn Prof. Dr. H. Weiß für die statistische Beratung.

Mein besonderer Dank gilt Frau B. Dlouhy und Herrn M. Bülte für ihre stets gewährte Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Ich danke ferner allen Mitarbeitern des Institutes für Fleischhygiene, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit behilflich waren.

Dem Herrn Feinmechanikermeister Bienek möchte ich für die Anfertigung des Vielfachfiltrationsgerätes danken.

Herrn Dr. Katsaras danke ich für die Überlassung der Photographien der Abbildungen 1 und 2.

Lebenslauf

Helmut Loos

geb. am 10.10.1950

Vater: Ernst-Günther Loos

Mutter: Erna Loos, geb. Groth

Schulbildung:

1957-1963 Besuch der Grundschule

1963-1970 Besuch des Tannenberg-Gymnasiums, Berlin-Steglitz

Januar 1970 Abitur

1970-1973 Ausbildung zum Apothekerassistenten

März 1973 Pharmazeutische Vorprüfung

Studium

ab WS 1974/75 Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

Tierärztliche Vorprüfung am 28.3.1977

Abschluß des Staatsexamens am 8.7.1980

Approbation: 23.7.1980

Von August 1980 bis Dezember 1982 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Fleischhygiene der WE Lebensmittelhygiene, Fleischhygiene und -technologie der Freien Universität Berlin.

